

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Jana Spáčilová

Studium molekulární a biochemické podstaty primární deficiencie koenzymu Q₁₀
The molecular and biochemical basis of primary coenzyme Q₁₀ deficiency

Diplomová práce

Školitel: Ing. Kateřina Veselá, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Kateřině Veselé, PhD. za citlivé vedení, vstřícnost, trpělivost a ochotu předat maximum zkušeností a dovedností, bez které by tato práce nikdy nevznikla.

Mé poděkování si zaslouží také kolektiv Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch, KDDL 1.LF UK a VFN Praha, jmenovitě RNDr. Hana Hansíková, CSc. za konzultace v biochemické části práce a RNDr. Jana Sládková, CSc. za konzultace při přípravě modelových tkáňových kultur. Dále bych ráda poděkovala Dádě Sedláčkové za zasvěcení do měření aktivit enzymů a Hance Kratochvílové za její proteomicko-pedagogické nadání.

V neposlední řadě děkuji rodičům za podporu a zájem o mou práci v průběhu studia a rodině, přátelům a zejména sestře za psychickou první pomoc, o které třeba ani nevěděli.

Tato práce vznikla s podporou grantového projektu Výzkumný záměr MSM 0021620806.

1 Obsah

Poděkování	3
1 Obsah	4
1.1 Seznam obrázků	6
1.2 Seznam tabulek	6
1.3 Seznam grafů	7
Abstrakt	8
Abstract	9
2 Úvod	10
2.1 Cíle	11
3 Literární přehled	12
3.1 Mitochondrie a oxidativní fosforylace	12
3.2 Mechanismus působení systému oxidativní fosforylace	13
3.3 Koenzym Q	14
3.3.1 Lokalizace koenzymu Q	14
3.3.2 Hlavní funkce koenzymu Q	15
3.3.3 Další funkce koenzymu Q	16
3.3.4 Endogenní biosyntéza a biologický obrat koenzymu Q u eukaryotních organismů	16
3.4 Deficience koenzymu Q ₁₀	18
3.4.1 Primární deficience koenzymu Q ₁₀	19
3.4.2 Sekundární deficience koenzymu Q ₁₀	20
3.5 Geny analyzované v souvislosti s primární deficiencí koenzymu Q ₁₀	21
3.5.1 <i>PDSS1</i> a <i>PDSS2</i>	21
3.5.1.1 Popsané mutace genů <i>PDSS1</i> a <i>PDSS2</i> související s primární deficiencí koenzymu Q ₁₀	22
3.5.2 <i>COQ2</i>	22
3.5.2.1 Popsané mutace genu <i>COQ2</i> související s primární deficiencí koenzymu Q ₁₀	22
3.5.3 <i>COQ9</i>	23
3.5.3.1 Popsané mutace genu <i>COQ9</i> související s primární deficiencí koenzymu Q ₁₀	24
3.5.4 <i>CABC1</i>	24
3.5.4.1 Popsané mutace genu <i>CABC1</i> související s primární deficiencí koenzymu Q ₁₀	25
3.5.5 <i>APTX</i>	25
3.5.5.1 Popsané mutace genu <i>APTX</i> související se sníženou hladinou koenzymu Q ₁₀	26
3.6 Možnosti studia deficience koenzymu Q ₁₀ <i>in vitro</i>	26
3.6.1 Inhibice biosyntézy koenzymu Q ₁₀ prostřednictvím 4-aminoderivátů kyseliny benzoové	27
3.6.1.1 Kyselina 4-aminobenzoová	27
3.7 Pacienti s důvodným podezřením na primární deficienci koenzymu Q ₁₀	28
4 Materiál a metody	30
4.1 Materiál	30
4.2 Metody	30
4.2.1 Molekulárně-genetické analýzy	30

4.2.1.1	Optimalizace PCR reakcí	30
4.2.1.2	High Resolution Melting Analysis	30
4.2.1.3	Sekvenování genů.....	31
4.2.2	Analýzy modelu deficiencie koenzymu Q ₁₀ <i>in vitro</i>	34
4.2.2.1	Kultivace fibroblastů při zátěži 4-aminobenzoovou kyselinou	34
4.2.2.2	Sklízení buněk	35
4.2.2.3	Vitální barvení buněk	35
4.2.3	Biochemické analýzy.....	37
4.2.3.1	Stanovení koncentrace proteinů.....	37
4.2.3.2	Příprava vzorků pro měření vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ...	37
4.2.3.3	Příprava kalibrační křivky pro měření koncentrace koenzymu Q ₁₀	37
4.2.3.4	Měření koncentrace koenzymu Q ₁₀	38
4.2.3.5	Příprava vzorků pro SDS-elektroforézu	38
4.2.3.6	SDS-elektroforéza	39
4.2.3.7	Semi-dry western blot	39
4.2.3.8	Měření aktivit komplexů dýchacího řetězce.....	39
5	Výsledky.....	43
5.1	Analýza genů <i>PDSS1</i> , <i>PDSS2</i> , <i>COQ2</i> , <i>COQ9</i> , <i>CABC1</i> a <i>APTX</i>	43
5.1.1	Optimalizace PCR reakcí	43
5.1.2	High Resolution Melting Analysis	43
5.1.3	Sekvenování genů <i>PDSS1</i> , <i>PDSS2</i> , <i>COQ2</i> , <i>COQ9</i> , <i>CABC1</i> a <i>APTX</i>	45
5.2	Analýzy modelu deficiencie koenzymu Q ₁₀ <i>in vitro</i>	47
5.2.1	Viabilita	47
5.2.2	Mitochondriální síť.....	47
5.2.3	Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích.....	49
5.2.4	Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v rámci celé buňky	51
5.2.5	Ultrastruktura mitochondrií	53
5.3	Biochemické analýzy.....	55
5.3.1	Měření změn koncentrace koenzymu Q ₁₀	55
5.3.2	Spektrofotometrická měření aktivit enzymů dýchacího řetězce.....	57
5.3.3	Imunodetekce podjednotek komplexů dýchacího řetězce	59
6	Diskuse	61
6.1	Molekulárně-genetické analýzy genů.....	61
6.2	Analýzy modelu deficiencie koenzymu Q ₁₀ <i>in vitro</i>	62
6.2.1	Měření změn koncentrace koenzymu Q ₁₀	63
6.2.2	Charakterizace kultivovaných fibroblastů a HEK293 buněk	64
6.3	Biochemické analýzy.....	66
7	Závěr.....	68
8	Literatura	70
9	Seznam zkratk.....	75
10	Vysvětlivky.....	77
11	Slovník pojmů	78
12	Přílohy	80
12.1	Seznam příloh.....	80
12.1.1	Použité přístroje.....	80
12.1.2	Použité chemikálie.....	81
12.1.3	Roztoky.....	84

1.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Systém oxidativní fosforylace.....	13
Obrázek 2: Struktura molekuly koenzymu Q.....	14
Obrázek 3: Modely mechanismu přenosu redukčních ekvivalentů z komplexu I prostřednictvím koenzymu Q.	15
Obrázek 4: Model enzymatického komplexu, který syntetizuje koenzym Q, u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Tran and Clarke 2007).	18
Obrázek 5: Schéma biosyntézy koenzymu Q ₁₀ u eukaryot	19
Obrázek 6: Schéma předpokládaných modifikací benzochinonového kruhu v biosyntéze koenzymu Q ₆ u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Obrázek 7: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu <i>COQ2</i> – schéma 96jamkové destičky.	44
Obrázek 8: Jednobázový nepatogenní polymorfismus v kódující sekvenci fragmentu 5 genu <i>COQ2</i> (rs6535454).	46
Obrázek 9: Test viability kultury lidských kožních fibroblastů (HSF3) po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	47
Obrázek 10: Morfologie mitochondriálních sítí kultur lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	48
Obrázek 11: Optimalizace expozičního času pro detekci přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou v kultuře lidských kožních fibroblastů.....	49
Obrázek 12: Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.....	50
Obrázek 13: Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v rámci celé buňky u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.....	52
Obrázek 14: Ultrastruktura mitochondrií u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	54
Obrázek 15: Analýza obsahu podjednotek komplexů dýchacího řetězce a ATPázy v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	60

1.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Další funkce koenzymu Q	16
Tabulka 2: Porovnání homologů biosyntézy koenzymu Q ₁₀ u člověka, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a <i>Escherichia coli</i> včetně předpokládané funkce.	17
Tabulka 3: Koncentrace koenzymu Q ₁₀ ve vzorku svalu pacientů s podezřením na primární deficienci koenzymu Q ₁₀	28
Tabulka 4: Aktivity mitochondriálních enzymů ve svalové tkáni u pacientů s podezřením na deficienci koenzymu Q ₁₀	29
Tabulka 5: Sekvence specifických primerů.....	32
Tabulka 6: Složení PCR směsí a podmínky PCR reakcí	33
Tabulka 7: Ředění vzorků pro přípravu kalibrační křivky pro měření koenzymu Q ₁₀ pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	38
Tabulka 8: Ředění primárních myších (králíčích) protilátek.....	40
Tabulka 9: Jednobázové polymorfismy nalezené v sekvencích exonů a přilehlých intronních oblastí genů <i>PDSS1</i> , <i>PDSS2</i> , <i>COQ2</i> , <i>COQ9</i> , <i>CABC1</i> a <i>APTX</i> pacientů P1 – P12.	46

Tabulka 10: Koncentrace koenzymu Q ₁₀ v lidských kožních fibroblastech (HSF1) po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	56
Tabulka 11: Koncentrace koenzymu Q ₁₀ po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou u kultur HSF1 – HSF3 a HEK293.	56
Tabulka 12: Změny detekovaného signálu podjednotek OXPHOS po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	60
Tabulka 13: Klinické projevy pacientů s podezřením na deficienci CoQ ₁₀	86

1.3 Seznam grafů

Graf 1: Kalibrační přímka pro měření koncentrace koenzymu Q ₁₀	38
Graf 2: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu <i>COQ2</i> – normalizované křivky intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.	43
Graf 3: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu <i>COQ2</i> – derivace křivek intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.	44
Graf 4: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 3 genu <i>COQ2</i> – derivace křivek intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.	45
Graf 5: Relativní koncentrace koenzymu Q ₁₀ po kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou u HSF1 a HSF2.....	56
Graf 6: Relativní koncentrace koenzymu Q ₁₀ po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou v kulturách lidských kožních fibroblastů HSF1 – HSF3 a HEK293.	57
Graf 7: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách a po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.	58
Graf 8: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou normalizované na aktivitu citrátsyntázy.	58
Graf 9: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou normalizované na aktivitu komplexu II.....	59

Abstrakt

Tato diplomová práce se věnuje poruchám koenzymu Q_{10} , které vedou ke snížení jeho koncentrace ve tkáních pacientů (tzv. deficiencie CoQ_{10}). Zavádí dvě molekulárně-genetické metody pro analýzy deficiencie CoQ_{10} - skriningovou metodu High Resolution Melting Analysis pro usnadnění vyřídění potenciálních pacientů s mutací v genech *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*, které kódují některé z enzymů účastnících se biosyntézy CoQ_{10} , a metodu přímého sekvenování kódujících sekvencí těchto genů a jim přilehlých intronních oblastí.

Dále se snaží charakterizovat model deficiencie CoQ_{10} na *in vitro* kultivovaných lidských fibroblastech a linii HEK293. Deficiencie je v tomto případě navozena působením inhibitoru biosyntézy CoQ_{10} – kyseliny 4-aminobenzoové o koncentraci 1 mmol.dm^{-3} v médiu. Bylo zjištěno, že se po 4denním působení tohoto inhibitoru koncentrace CoQ_{10} u kultur fibroblastů a linie HEK293 snížila na 60 – 70 % kontroly, resp. 41 % kontroly v případě linie HEK293, přitom nedošlo ke změnám viability buněk ani morfologie mitochondriálních sítí. Zjistili jsme mírné zvýšení přítomnosti reaktivních forem kyslíku po kultivaci s inhibitorem, a to zejména superoxidových radikálů, ovšem ultrastruktura mitochondrií zřejmě zůstala nezměněna. V neposlední řadě se práce věnuje změnám aktivit komplexů dýchacího řetězce a exprese některých podjednotek těchto enzymů v modelových buňkách. Po působení inhibitoru byly naměřeny snížené hodnoty spřažených aktivit komplexů I-III a II-III. Na základě tohoto výsledku můžeme říci, že měření snížené aktivity komplexů I-III a II-III je jedním z možných ověření deficiencie CoQ_{10} u pacientů (mimo stanovení koncentrace CoQ_{10} ve svalu a fibroblastech). Naopak změny v expresi podjednotek OXPHOS na tomto modelu nejsou specifické. Nicméně vytvořený model je vhodný pro další studium deficiencie CoQ_{10} .

Klíčová slova: koenzym Q_{10} , mitochondrie, 4-aminobenzoová kyselina

Abstract

This diploma thesis focus on disorders of coenzyme Q₁₀, which lead to decrease of its concentration in certain patient's tissues (CoQ₁₀ deficiency). This thesis introduces two molecular-genetics methods for CoQ₁₀ deficiency analysis. The first one is a screening method - High Resolution Melting Analysis, which is a useful tool for screening of a large group of patients with possible mutations in *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* and *APTX* genes, which encode some enzymes of CoQ₁₀ biosynthetic pathway. The second one is direct sequencing of coding sequences of these genes including intron sequences neighbouring exons.

This work also describes a model of CoQ₁₀ deficiency applied *in vitro* using cultured human skin fibroblasts and HEK293 cells. In this case CoQ₁₀ deficiency is evoked by CoQ₁₀ biosynthesis inhibitor – 4-aminobenzoic acid (concentration 1 mmol.dm⁻³). 4 days treatment by 4-aminobenzoic acid caused decrease in CoQ₁₀ level in fibroblasts and HEK293 cells (60 - 70 % of control, resp. 41 % of control in case of HEK293 cells), although cell viability and morphology of mitochondria remained unchanged. Our results declare that there was slightly increased reactive oxygen species concentration after treatment, especially the amount of superoxide radicals; nevertheless the ultrastructure of mitochondria stayed unchanged. Last but not least aim of this work was to study changes in oxidative phosphorylation system (OXPHOS) complexes activity and expression of certain subunits of these enzymes. After treatment we measured decreased coupled activities of complexes I-III and II-III in treated cells. We can say that the measurement of coupled activities of I-III and II-III is an opportunity to validate CoQ₁₀ deficiency in patients (beside of CoQ₁₀ concentration measurements in muscle and fibroblasts). No specific changes of OXPHOS subunits expression were observed in this model. The model is still useable for future studies of CoQ₁₀ deficiency.

Key words: coenzyme Q₁₀, mitochondria, 4-aminobenzoic acid

2 Úvod

Porucha vedoucí ke snížené koncentraci koenzymu Q_{10} (CoQ₁₀) ve tkáních (tzv. deficiencie CoQ₁₀) je poměrně vzácným onemocněním. V laboratořích, včetně Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch (LPSMP), I.LF UK a VFN Praha, se rutinně stanovuje koncentrace CoQ₁₀ v krevní plazmě, ve svalu i dalších tkáních. Případů pacientů s biochemicky prokázanou deficiencí CoQ₁₀ je celá řada. Příčiny deficiencie CoQ₁₀ nejsou ovšem takřka nikdy známy. Navíc klinické nálezy pacientů s prokázanou molekulární podstatou tohoto onemocnění jsou velmi rozmanité, což znesnadňuje indikaci konkrétního vyšetření na základě klinického nálezu pacienta. Samotná molekulární diagnostika deficiencie CoQ₁₀ je zatím poměrně komplexní záležitostí, neboť biosyntetické dráhy CoQ₁₀ se účastní celá řada enzymů a všechny její dílčí kroky nejsou detailně prozkoumány.

V posledních dvaceti letech byly postupně u několika pacientů popsány patogenní mutace v genech *APTX*, *CABC1*, *COQ2*, *COQ9*, *PDSS1* a *PDSS2*, které kódují právě enzymy účastnící se biosyntézy CoQ₁₀. V LPSMP byl ke studiu vybrán soubor pacientů, kteří se biochemickým i klinickým nálezem podobali již popsaným případům s primární deficiencí CoQ₁₀ a mohli by nést patogenní mutaci v některém genu kódujícím enzym biosyntézy CoQ₁₀.

Pro účely studia deficiencie CoQ₁₀ bylo navrženo několik modelů na *in vitro* kultivovaných buňkách. Biosyntéza CoQ₁₀ byla inhibována pomocí analogů prekurzorů samotného CoQ₁₀. Všechny dosud publikované modely deficiencie CoQ₁₀ byly aplikovány na imortalizované nebo nádorové linie buněk. Naším cílem bylo pokusit se model aplikovat na primární kultury buněk, jejichž chování bude více srovnatelné s chováním zdravých lidských buněk. Charakterizovat změny, ke kterým bude docházet po inhibici biosyntézy CoQ₁₀, a porovnat je s výsledky již publikovaných studií. Pro náš model byly vybrány primární kultury fibroblastů, protože v rámci klinické diagnostiky jsou jedním z nejdostupnějších typů buněk, které lze získat od pacientů, úspěšně kultivovat a snadno studovat. Model by se tedy následně mohl použít pro studium buněk pacientů s deficiencí CoQ₁₀.

Tato diplomová práce si kladla za cíl:

2.1 Cíle

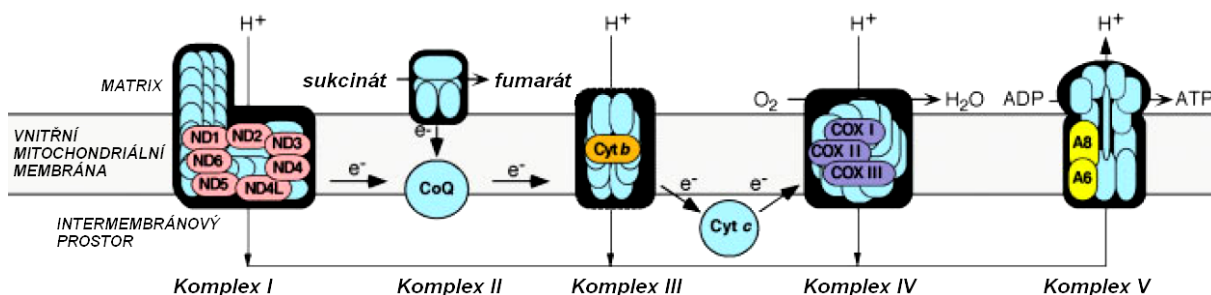
1. Zavést molekulární diagnostiku kódujících sekvencí genů *APTX*, *CABC1*, *COQ2*, *COQ9*, *PDSS1* a *PDSS2*.
2. Analyzovat kódující sekvence genů *APTX*, *CABC1*, *COQ2*, *COQ9*, *PDSS1* a *PDSS2* u vybraných pacientů s podezřením na primární deficienci koenzymu Q₁₀.
3. Studovat model deficiencie koenzymu Q₁₀ *in vitro* na kulturách kultivovaných fibroblastů zdravých kontrol a linii HEK293.

3 Literární přehled

3.1 Mitochondrie a oxidativní fosforylace

Mitochondrie jsou membránové organely eukaryotických buněk, které pravděpodobně vznikly endocytózou prokaryotického organismu. Tuto endosymbiotickou teorii Lynn Margulisové (Margulis, 1975) podporuje hned několik faktů – mitochondrie mají svou vlastní kruhovou DNA, proteosyntetický aparát podobný prokaryotnímu a v buňce je ohraničuje vnější a vnitřní mitochondriální membrána. Také fylogenetické analýzy prokazují jejich příbuznost s řádem *Rickettsiales* na základě sekvenční homologie 12S a 16S rDNA (Gupta and Golding, 1996); (Emelyanov, 2001).

Hlavní funkcí mitochondrií je produkce energie. Na vnitřní membráně mitochondrií se nachází soubor enzymů – komplexů systému oxidativní fosforylace (OXPHOS). Ty zajišťují vznik elektrochemického gradientu na vnitřní mitochondriální membráně prostřednictvím přenosu elektronů. Donory elektronů a protonů jsou redukované ekvivalenty vznikající v metabolických drahách – zejména citrátovém cyklu a β -oxidaci mastných kyselin (např. nikotinamid adenin dinukleotid - NADH). Celý tento děj se nazývá oxidativní fosforylace. Hlavním konečným produktem je adenosin 5'-trifosfát (ATP). Pod pojmem OXPHOS rozumíme celkem pět multipodjednotkových komplexů. Jedná se o NADH:ubichinon reduktázu (EC 1.3.5.1) označovanou jako komplex I, sukcinát:koenzym Q reduktázu (EC 1.3.5.1) označovanou jako komplex II, event. sukcinátdehydrogenázu (SDH). Dále následuje komplex III, což je ubichinol:cytochrom *c* reduktáza (EC 1.9.3.1). Komplexem IV je cytochrom *c* oxidáza (EC 3.1) a komplexem V je ATPsyntáza (EC 3.6.3.14). Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) je kruhová molekula o 16 569 bp. Kóduje jen 37 genů, z toho pouze 13 genů kóduje podjednotky komplexů OXPHOS. Všechny ostatní podjednotky komplexů OXPHOS a jiné mitochondriální enzymy jsou kódovány jaderně a do mitochondrie jsou transportovány až v průběhu exprese proteinu (Wallace, 2005). Jediným komplexem, jehož žádná část není kódována mtDNA, je komplex II.



Obrázek 1: Systém oxidativní fosforylace

CoQ – koenzym Q; H^+ - proton; e^- - elektron; Cyt – cytochrom; ADP - adenosin 5'-difosfát; ATP - adenosin 5'-trifosfát; růžově, oranžově, fialové a žlutě – mitochondriálně kódované podjednotky komplexů; modře – jaderně kódované podjednotky komplexů (DiMauro et al., 2006).

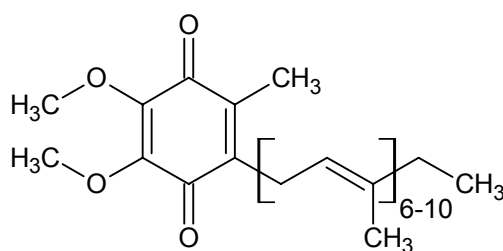
3.2 Mechanismus působení systému oxidativní fosforylace

Metabolismus sacharidů a lipidů zajišťuje přísun elektronů na komplex I prostřednictvím NADH, resp. v podobě sukcinátu přímo na komplex II. Tyto elektrony redukují membránový přenašeč – koenzym Q – který se regeneruje na komplexu III. Cytochrom c přenáší elektrony z komplexu III na komplex IV. Konečným akceptorem elektronů na komplexu IV je molekula kyslíku, která je redukována na vodu. Energie získaná tokem elektronů mezi komplexy je využita k pumpování protonů ven z matrix do mezimembránového prostoru. Vzniklý elektrochemický gradient protonů je využit k syntéze ATP, která probíhá na komplexu V. Hydrolýzou vazby mezi β - a γ -fosfátem ATP vznikají produkty s mnohem nižší energií (v porovnání s ATP) a tento rozdíl je využitelný ke katalýze endotermních reakcí v buňce.

Vedlejšími produkty metabolických pochodů, jsou tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS), mezi které patří volné radikály, peroxidy, singletový kyslík nebo také oxid dusnatý (NO). ROS mohou poškozovat takřka všechny biomolekuly v buňce: způsobují změny na membránách, mutace DNA nebo poškození enzymů. Nadměrné hromadění ROS a následná poškození buňky shrnujeme obecně pod názvem oxidativní stres, který může vyústit až v nevratné nastartování apoptotických drah. Eukaryotické buňky se oxidativnímu poškození brání antioxidantními systémy - např. souborem různých superoxid dismutáz, produkcí molekul s antioxidantními vlastnostmi – glutathion, α -tokoferol, koenzym Q a další. V mitochondriích vznikají ROS zejména na komplexech I a III (Brand, 2010).

3.3 Koenzym Q

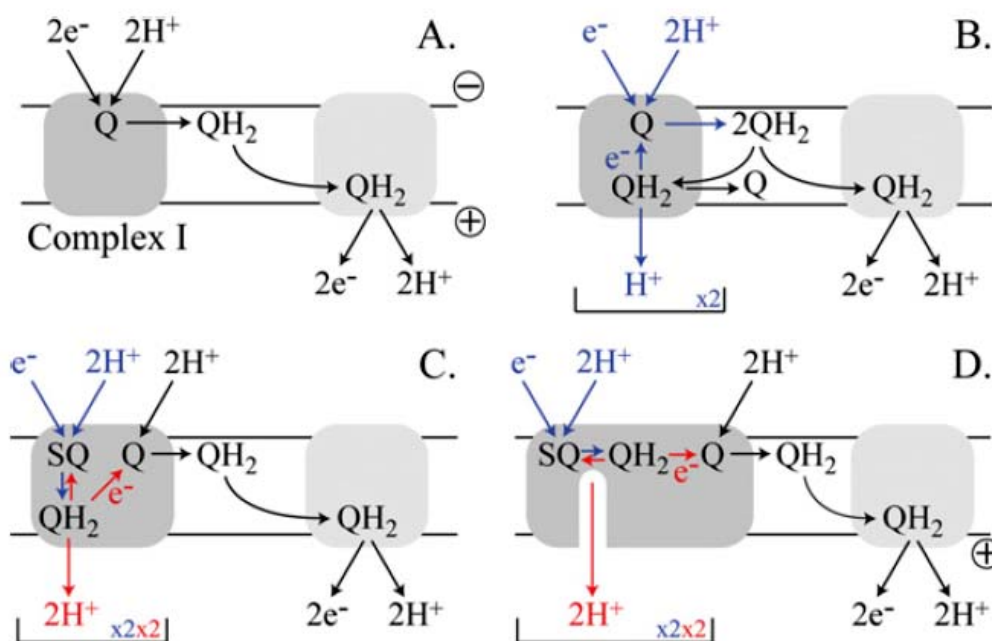
Koenzym Q (CoQ) byl poprvé izolován v roce 1955 (Festenstein, 1955; Festenstein et al., 1955), o pár let později byla popsána jeho role v tzv. Q cyklu oxidativního řetězce (Mitchell, 1975). Tedy sled oxidace, redukce a reoxidace CoQ na komplexu III, který efektivně využívá vlastností přenašeče elektronů. CoQ je lipofilní sloučenina – chemicky jde o 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-polyizoprenylparabenzochinon. Jednotlivé typy CoQ se v závislosti na organismu liší počtem izoprenoidních jednotek, které tvoří dlouhý nepolární řetězec koenzymu Q. Setkáváme se nejčastěji s variantami od tří až do dvanácti podjednotek, u člověka většinou s deseti (Szkopinska, 2000). Počet jednotek udává dolní index v názvu koenzymu (např. koenzym Q₁₀, CoQ₁₀). Celý řetězec nenasycených dvojných vazeb izoprenoidních jednotek má *trans* konfiguraci a je zodpovědný za ukotvení CoQ do membránové dvojvrstvy. Řetězec může v membráně existovat jako volný, nebo i složený do kratších kompaktnějších struktur. Dynamicky tak přispívá ke stabilizaci membrán (Lenaz et al., 1999). Benzochinonový kruh je orientován na vnější stranu dvojvrstvy a může komunikovat s polárními částmi fosfolipidů a dalšími enzymy. Substituované aromatické jádro může být oxidováno (oxidovaná forma CoQ se nazývá ubichinon), nebo naopak redukováno (ubichinol). Pod termínem koenzym Q rozumíme obě formy. Procentuální zastoupení jednotlivých forem se může měnit v závislosti na redoxním prostředí v buňce a metabolické aktivitě mitochondrií a pohybuje se v rozmezí 30 – 90 % ubichinolu (Turunen et al., 2004).



NADH oxidáza na vnější cytoplazmatické membráně redukuje disulfidické můstky nebo kyslík a reguluje poměr NAD^+/NADH . Tyto děje pravděpodobně regulují buněčný cyklus a diferenciaci buňky (Crane et al., 1985).

3.3.2 Hlavní funkce koenzymu Q

Hlavní funkcí CoQ je bezesporu přenos elektronů z komplexu I a komplexu II na komplex III dýchacího řetězce mitochondrií. Problematicke procesů spojených s funkcí komplexů I, II a III se věnuje celá řada studií (Lenaz et al., 2002); (Hirst, 2010) a jsou poměrně podrobně popsány (Obrázek 3). Ovšem detailní informace týkající se působení CoQ jako jejich kofaktoru nejsou kompletní. Tato skutečnost vyplývá z lipofilního charakteru CoQ a transmembránové lokalizace domén s vazebnými místy pro CoQ (Hirst, 2010), která studium funkce enzymů komplikuje.



Obrázek 3: Modely mechanismu přenosu redukčních ekvivalentů z komplexu I prostřednictvím koenzymu Q.

A. Původní návrh Q cyklu (Mitchell, 1975). B. Mechanismus „oxidace indukované redukčním činidlem“. C. Cyklický přenos redukčních ekvivalentů mezi ubichinolem a semiubichinolem situovanými na opačných stranách membrány. D. Cyklický model přenosu elektronů mezi ubichinolem a semiubichinolem s totožným vazebným místem. Upraveno (Hirst, 2010). Q – ubichinon, SQ – semiubichinol, QH_2 – ubichinol, H^+ - proton; e^- - elektron.

3.3.3 Další funkce koenzymu Q

CoQ má kromě přenosu elektronů v dýchacím řetězci celou řadu dalších funkcí. Zdaleka ne všechny jsou důkladně prozkoumány. Obecně lze říci, že se zapojuje do regulačních procesů udržování homeostázy buňky, tedy do regulací buněčného cyklu od růstu a diferenciaci až po programovanou buněčnou smrt. Další funkce CoQ hodné zřetele jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Další funkce koenzymu Q

Upraveno dle (Bentinger et al., 2010; Turunen et al., 2004).

Fyziologické účinky	Mechanismus	Související protein	Reference
ochrana lipidů, proteinů, DNA před radikály	CoQ je oxidován radikály a znovu regenerován enzymy	oxidoreduktázy a další	(Ernster and Forsmarkandree, 1993)
růst a diferenciaci	regulace poměru NAD^+/NADH	NADH oxidáza	(GomezDiaz et al., 1997)
prevence spuštění apoptózy	brání translokaci větších proteinů do matrix a kolapsu mitochondriálních funkcí	MPT pór	(Papucci et al., 2003)
produkce tepla	přenos protonů ve směru gradientu	uncoupling proteiny	(Echtay et al., 2001)
protizánětlivé účinky	exprese genů (<i>in silico</i> studie)	např. NF- κ B	(Doring et al., 2007)
snížení rizika atherosklerózy	ochrana LDL před oxidací	oxidoreduktázy a další	(Thomas et al., 1996)
stimulace produkce NO v endotelu	aktivace jaderného receptoru	PPAR- α	(Hamilton et al., 2007)
oxidace sulfidů (kvasinky), tvorba disulfidických můstků (bakterie)	oxidovaný CoQ je redukován za vzniku disulfidického můstku	-	(Bentinger et al., 2010)

PPAR- α - z angl. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

MPT pór - složitý proteinový klastr tvořící pór v mitochondriální membráně

LDL - lipoprotein o nízké hustotě

NF- κ B - skupina transkripčních faktorů, které se váží na promotory RNA polymerázy II

3.3.4 Endogenní biosyntéza a biologický obrat koenzymu Q u eukaryotních organismů

Naprostá většina CoQ v organismech je endogenně syntetizována. U člověka připadá na exogenní zdroje z potravy jen 2 – 4 % (Turunen et al., 2004). Udává se, že obyvatelé vyspělých zemí přijímají v potravě 3 – 6 mg CoQ₁₀ za den. Množství, které se z potravy vstřebává, je ale omezené. Mechanismus vstřebávání je podobný příjmu vitamínu E a odehrává se v tenkém střevě (Bhagavan and Chopra, 2006).

Dosavadní poznatky týkající se biosyntézy CoQ zdaleka nejsou úplné a většina studií se zabývá modelem deficientních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Ashby and Edwards, 1990; Bousquet et al., 1991; Suzuki et al., 1997; Uchida et al., 2000).

Tabulka 2: Porovnání homologů biosyntézy koenzymu Q₁₀ u člověka, *Saccharomyces cerevisiae* a *Escherichia coli* včetně předpokládané funkce.

člověk	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	funkce
<i>PDSS1/PDSS2</i>	<i>COQ1</i>		syntéza polyizoprenoidního řetězce
<i>COQ2</i>	<i>COQ2</i>	<i>UbiA</i>	prenylace <i>p</i> -HB
<i>COQ3</i>	<i>COQ3</i>		modifikace - methylace
<i>COQ4</i>	<i>COQ4</i>		neznámá
<i>COQ5</i>	<i>COQ5</i>	<i>UbiE</i>	modifikace - methylace
<i>COQ6</i>	<i>COQ6</i>	<i>UbiH</i>	modifikace - hydroxylace
<i>COQ7</i>	<i>COQ7</i>	<i>UbiF</i> *	modifikace - hydroxylace
<i>CABC1(ADCK3)</i>	<i>COQ8</i>	<i>UbiB</i>	neznámá
<i>COQ9</i>	<i>COQ9</i>		neznámá

* - není homologem, ale restauruje respirační fenotyp kvasinkových mutantů Δ COQ7

tučně - geny analyzované v této diplomové práci

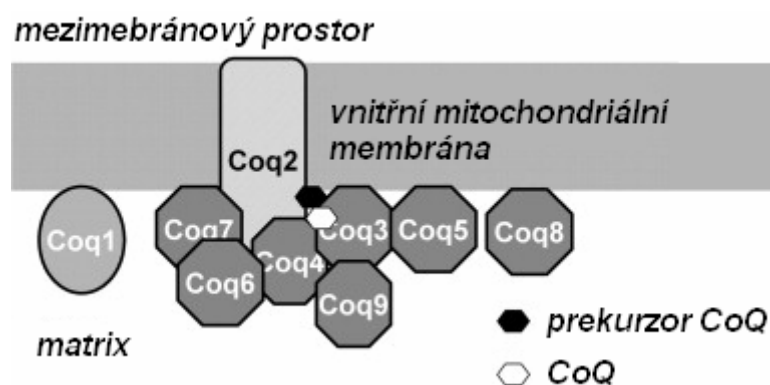
(zdroj: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>)

Biosyntéza CoQ probíhá do značné míry společně se syntézou cholesterolu, dolicholu a dalších izoprenoidů. Přestože je syntéza těchto látek spřažena, jednotlivé látky vznikají v různých množstvích díky specifické regulaci a poločas života jednotlivých produktů. Poločas života CoQ se pohybuje mezi 49 a 125 hodinami v závislosti na tkáni, ve které se nachází. Poločas života cholesterolu je až padesátkrát delší (Andersson et al., 1990).

Syntéza polyizoprenoidního prekursoru CoQ začíná kondenzací dvou molekul acetyl-CoA do podoby 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A (HMG-CoA). Sled reakcí, který následuje, se nazývá mevalonátová dráha. Jedním z hlavních enzymů této dráhy je HMG-CoA reduktáza, která redukuje HMG-CoA na mevalonát. Ačkoliv je HMG-CoA reduktáza v biosyntéze cholesterolu považována za regulační enzym a léčba zvýšené hladiny cholesterolu je zaměřena na inhibici tohoto enzymu pomocí tzv. statinů (Kumai et al., 2005), v biosyntéze CoQ hraje hlavní regulační roli zřejmě *trans*-prenyltransferáza, která z farnesyldifosfátu (FPP), konečného produktu mevalonátové dráhy, syntetizuje polyizoprenyldifosfát. Z chemického hlediska pod pojmem statiny rozumíme různorodou skupinu organických látek na přírodní či syntetické bázi, které způsobují snížení hladiny cholesterolu. Přestože léčba statiny přímo biosyntézu jiných izoprenoidů neovlivňuje, mezi vedlejší účinky této léčby může patřit i snížení biosyntézy CoQ nebo prenylace proteinů. (Kumai et al., 2005). Polyizoprenyldifosfát je kondenzován s 4-hydroxybenzoovou kyselinou

(*p*-HB). *p*-HB je prekurzor benzochinonového kruhu, který vzniká z tyrosinu. Na třetí uhlík připojuje polyprenyl-4-hydroxybenzoát transferáza dlouhý nenasycený řetězec. Následuje sled modifikací benzochinonového kruhu, které nejsou ještě detailně popsány. Zahrnují hydroxylace na uhlíku, dekarboxylace, methylace na kyslíku i uhlíku (Obrázek 5). Detailněji je popsána jen biosyntéza u kvasinek. Enzymy, které jsou za tyto modifikace zodpovědné u člověka, byly predikovány na základě sekvenční homologie s kvasinkovými enzymy. Přesnější identifikace a mechanismy jejich působení ovšem nejsou dosud známy. Tran a Clarke popsali model komplexu enzymů vnitřní mitochondriální membrány kvasinky zahrnující enzymy kódované geny *COQ1-COQ9* - (Tran and Clarke, 2007); (Johnson et al., 2005; Tzagoloff and Dieckmann, 1990) – viz Obrázek 4.

Katabolismus CoQ zahrnuje podobně jako u jiných lipidů ω - a β -oxidaci nenasyceného polyizoprenoidního řetězce a následnou fosforylaci vzniklých produktů, které jsou vyloučeny močí (Bentinger et al., 2003).

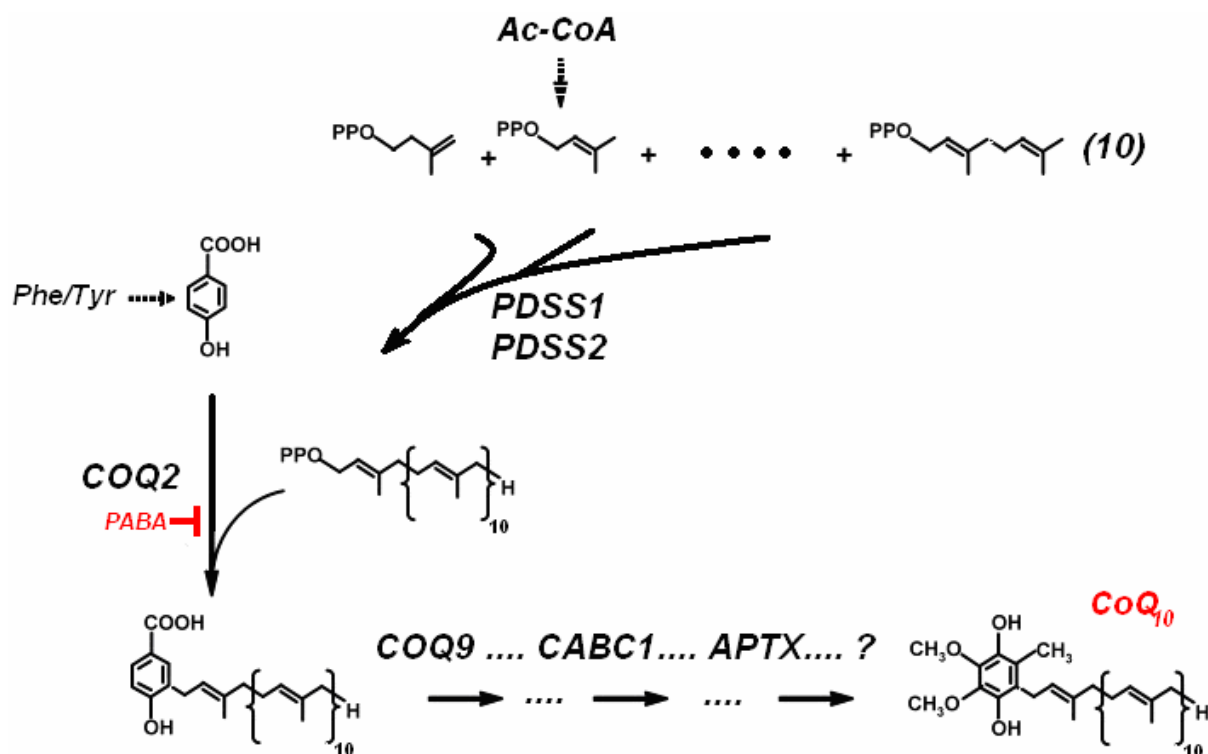


Obrázek 4: Model enzymatického komplexu, který syntetizuje koenzym Q, u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Tran and Clarke 2007).
CoQ – koenzym Q.

3.4 Deficience koenzymu Q_{10}

Pod pojmem deficience CoQ₁₀ rozumíme u člověka sníženou koncentraci CoQ₁₀ ve tkáni či plazmě. Koncentrace CoQ₁₀, která se fyziologicky vyskytuje v jednotlivých tkáních se v průběhu života mění. Je prokázáno, že po 20. roce života se hladina CoQ snižuje. U experimentů je proto vhodné zavádět dvojí kontroly – pro dospělé a pro děti a mladistvé. Hladina CoQ₁₀ v krevní plazmě nemusí být ukazatelem snížené hladiny CoQ₁₀ v ostatních tkáních. CoQ₁₀ obsažený v krevní plazmě vzniká v játrech jako součást VLDL, kde chrání lipoproteiny před oxidací volnými radikály. Jeho distribuce do ostatních orgánů je ale velmi

omezená (Bentinger et al., 2010). Podle příčiny rozdělujeme deficiencie CoQ₁₀ na primární a sekundární.

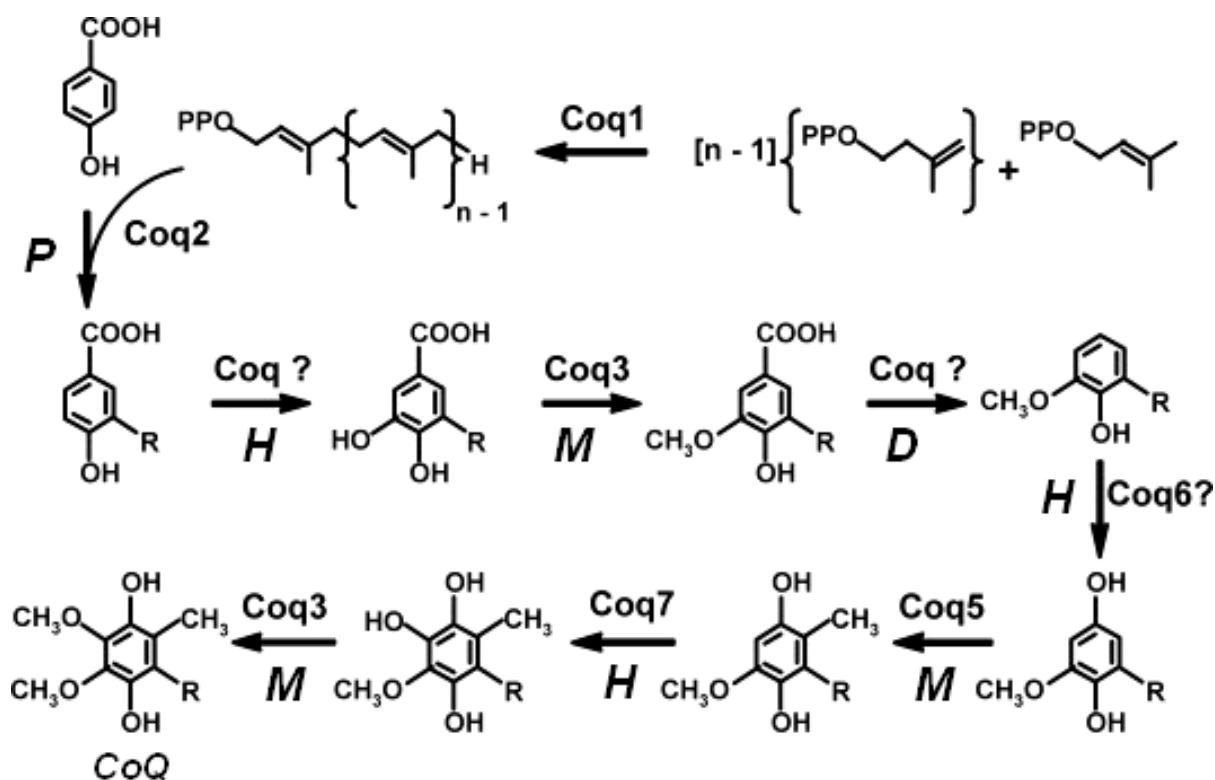


Obrázek 5: Schéma biosyntézy koenzymu Q₁₀ u eukaryot

Prekurzor polyprenyldifosfát vzniká mevalonátovou dráhou z acetyl-koenzymu A. Je syntetizován polyprenyldifosfátsyntázou, která je kódována dvěma geny – *PDSS1* a *PDSS2*. Prekurzor 4-hydroxybenzoová kyselina je syntetizována z aminokyselin. Kondenzaci polyprenyldifosfátu a 4-hydroxybenzoové kyseliny zajišťuje 4-hydroxybenzoát-polyprenyltransferáza, kterou kóduje gen *COQ2*. Polyprenylovaná 4-hydroxybenzoová kyselina je následně v několika krocích modifikována na aromatickém kruhu. Modifikací se zřejmě účastní celá řada enzymů (včetně produktů genů *COQ9*, *CABC1*, *APTX* a dalších) – vzniká koenzym Q₁₀; Ac-CoA – acetyl-koenzym A; PP – difosfát; Phe – fenylalanin; Tyr – tyrosin; CoQ₁₀ – koenzym Q₁₀; přerušovaná šipka – více kroků; značkou (⊥) je označeno místo inhibice 4-aminobenzoové kyseliny (PABA). Upraveno dle (Duncan et al., 2009) a (Tran and Clarke 2007).

3.4.1 Primární deficiencie koenzymu Q₁₀

Primární deficiencie (OMIM: 607426) vznikají na základě mutací v genech kódujících enzymy biosyntézy CoQ₁₀. Klinický obraz pacientů je velmi rozmanitý v závislosti na postiženém genu i typu mutace. Dosud byly popsány případy pacientů s patogenní mutací v genech *PDSS1* (ID: 23590), *PDSS2* (ID: 57107), *COQ2* (ID: 27235), *COQ9* (ID: 57017), *CABC1* (ID: 56997) a původně i *APTX* (ID: 54840). Ukazuje se ale, že mutace *APTX* jsou spojeny s deficiencí sekundární.



Obrázek 6: Schéma předpokládaných modifikací benzochinonového kruhu v biosyntéze koenzymu Q₆ u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

D – dekarboxylace; H – hydroxylace; M- methylace; P – prenylace; PP – difosfát; n – počet izoprenoidních jednotek (6), R – polyizoprenoidní řetězec. Upraveno dle (Tran and Clarke 2007).

3.4.2 Sekundární deficiencie koenzymu Q₁₀

Sekundární deficiencie CoQ₁₀ mohou být výsledkem mutací v genech, které se přímo neúčastní biosyntézy CoQ₁₀. Se sekundární deficiencí CoQ₁₀ tohoto typu jsou spojeny například defekty v elektron-transferovém flavoproteinu genu *ETF*A (OMIM: 231680) a ETF-ubichinon oxidoreduktázy genu *ETF-QO* (OMIM: 231675), které způsobují deficienci acyl-CoA-dehydrogenázy a acidurii kyseliny glutarové typu II. Deficiencie CoQ₁₀ se nevyskytuje u všech pacientů a mechanismus jejího vzniku není známý (Curcoy et al., 2003; Liang et al., 2009). Tito pacienti mnohdy trpí myopatiemi, které jsou společným klinickým projevem pacientů s deficiencí CoQ₁₀. Dalším příkladem jsou zřejmě i mutace genu *APTX*, kódující aprataxin. Pacienti nesoucí takové mutace trpí nejen deficiencí CoQ₁₀, ale zejména ataxií spojenou s okulomotorickou apraxií (poruchy koordinace pohybu a obtíže při pohybech očima). Sekundární deficiencie mohou být vyvolány i exogenně např. působením zmíněných

statinů (lovastatin, simvastatin a další). Dále se jimi až na mutace genu *APTX* nebudeme zabývat.

3.5 Geny analyzované v souvislosti s primární deficiencí koenzymu Q_{10}

3.5.1 *PDSS1* a *PDSS2*

Geny *PDSS1* a *PDSS2* (ID: 23590 a 57107) jsou homology kvasinkového genu *COQ1* (ID: 852288). Kódují podjednotky 1, resp. 2 polyprenyldifosfát syntázy (PDS), která katalyzuje vznik all-*trans*-polyprenyldifosfátu z izopentyldifosfátu (viz Obrázek 5). Jedná se o enzym, který určuje rychlost syntézy CoQ (angl. „rate-limiting enzyme“), neboť určuje dostupnost nenasyceného prekursoru CoQ, která není nadlimitní. Tento heterotetramerní enzym (a jeho podjednotkové složení) určuje, jaký typ CoQ se bude syntetizovat, neboť enzym 4-hydroxybenzoát polyprenyltransferáza (Coq2p), který nenasycený prekursor bude později kondenzovat s benzochinonovým jádrem, není specifický vůči délce polymerního substrátu.

Gen *PDSS1* se nachází na desátém chromozomu (10p12.1), lokus má 48 762 bp a obsahuje celkem 12 exonů. Vznikající transkript o délce 1 248 bp kóduje protein tvořený 415 aminokyselinami (aa). Jeho celková molekulová hmotnost se pohybuje okolo 46 kDa.

Gen *PDSS2* se nachází na šestém chromozomu (6q21), celý lokus zahrnuje 304 667 bp, obsahuje 8 exonů, transkript o délce 1 200 bp je translatován do proteinu o délce 399 aa.

Studie v transformantech *Escherichia coli* ukazují, že myší a lidské podjednotky se podobají spíše enzymu kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, než *Saccharomyces cerevisiae*. Transformanty exprimující pouze jednu z podjednotek byly schopny syntetizovat pouze vlastní bakteriální CoQ₈. Buňky exprimující obě podjednotky PDS byly schopné syntetizovat také CoQ₉ i CoQ₁₀, jak je tomu u myši i člověka (Saiki et al., 2005). Polyprenyldifosfát syntáza je pravděpodobně asociována s vnitřní mitochondriální membránou (Tran and Clarke, 2007). Mechanismus transportu do mitochondrie dosud není znám.

Doposud byly popsány případy tří pacientů s mutacemi v genech *PDSS1* nebo *PDSS2*. Dva z nich byli sourozenci a měli shodnou patogenní mutaci (Mollet et al., 2007).

3.5.1.1 Popsané mutace genů *PDSS1* a *PDSS2* související s primární deficiencí koenzymu Q₁₀

Homozygotní c.977T>G transverze v exonu 10 genu *PDSS1* způsobuje záměnu aminokyselin p.D308E (rs119463988). Klinický nález syna a dcery marockých rodičů zahrnuje multisystémové onemocnění - časnou hluchotu, encefaloneuropatii, obezitu, *livedo reticularis* a valvulopatii. Pacienti měli normální hodnoty aktivit OXPHOS ve svalu, ale ve fibroblastech byly naměřeny snížené hodnoty aktivit komplexů II, III i II-III dýchacího řetězce. Heterozygotní sourozenci nejsou postiženi (Mollet et al., 2007).

Další popsáný pacient byl složený heterozygot nukleotidových záměn otcovské alely c.964C>T (rs118203955) a mateřské c.1145C>T (rs118203956) genu *PDSS2*. První záměna vede ke vzniku stop kodónu na pozici 322 (p.322Q>X), druhá k aminokyselinové záměně p.382S>L. Pacient trpěl Leigh syndromem a nefrotickým syndromem. Koncentrace CoQ₁₀ byla snižena jak ve svalu, tak i ve fibroblastech, v obou tkáních byla také naměřena snížená hodnota spážené aktivity II-III (Mollet et al., 2007).

3.5.2 COQ2

Gen *COQ2* kóduje enzym 4-hydroxybenzoát polyprenyltransferázu (Coq2p) katalyzující kondenzaci obou prekurzorů CoQ, tedy 4-hydroxybenzoové kyseliny s all-*trans*-polyprenyldifosfátem. Je homologem genu *UbiA E. coli*. Missense mutace genu *COQ2* byla vůbec první popsanou molekulární příčinou primární deficience CoQ₁₀ (Quinzii et al., 2006).

Gen *COQ2* leží na čtvrtém chromozomu (4q21.23), kódující sekvence se skládá ze 7 exonů, její celková délka je 20 716 bp, sestřižený transkript čítá 1 266 bp. Vznikající protein je tvořen 421 aa.

Model biosyntetického komplexu, který syntetizuje CoQ₁₀ na vnitřní mitochondriální membráně, předpokládá, že Coq2p hraje roli transmembránového kotvícího enzymu – viz Obrázek 4 (Tran and Clarke, 2007).

Doposud známe pět případů pacientů s patologickou mutací v genu *COQ2* (Salviati et al., 2005), (Mollet et al., 2007), (Diomedi-Camassei et al., 2007).

3.5.2.1 Popsané mutace genu *COQ2* související s primární deficiencí koenzymu Q₁₀

Gen *COQ2* pacienta trpícího časnou encefalomyopatií a neuropatií (Salviati et al., 2005) obsahoval homozygotní tranzici c.890A>G (rs121918230). Ta způsobuje záměnu

konzervovaného tyrosinu za cystein – p.297Y>C (Quinzii et al., 2006). Bylo prokázáno, že kvasinkové mutanty s touto mutací nebyly schopny respirovat (Lopez-Martin et. al, 2007). Pacient i jeho sestra měli snížené hodnoty spřažené aktivity I-III a II-III ve vzorcích svalové biopsie a sníženou aktivitu komplexu II-III ve fibroblastech, koncentrace CoQ₁₀ ve fibroblastech nedosahovala 30 % spodní hranice referenčního rozmezí.

Studie dvou postižených dětí příbuzných rodičů odhalila přítomnost jednobázové delece thyminu na pozici c.1198 u jednoho z pacientů. Delece má za následek posun čtecího rámce, změnu 21 následujících aminokyselin a předčasné ukončení exprese proteinu. Mezi popsáné klinické příznaky patřila anémie, selhání jater a nedostatečná funkce ledvin. Pacienti měli snížené hodnoty spřažených aktivit komplexu I-III i II-III v jaterním homogenátu. Oba pacienti zemřeli na rozsáhlá multiorgánová selhání ve věku jednoho a 12 dní (Mollet et al., 2007).

V tomtéž roce byly publikovány další dva případy pacientů s CoQ₁₀ deficiencí (Dimedi-Camassei et al., 2007). U prvního z nich se v 18 měsících života rozvinula nefropatie a glomerulopatie bez dalších patologických symptomů. Analýzy potvrdily přítomnost dvou heterozygotních mutací v genu *COQ2* – na mateřské alele c.590G>A tranzice (rs121918231) způsobující aminokyselinovou záměnu p.R197H a na otcovské alele c.683A>G tranzice (rs121918232) způsobující zařazení p.S228R. Druhý pacient vykazoval oligurii a těžké poškození ledvin, které vyústilo v jejich fatální selhání ve věku 6 měsíců. Jednalo se o homozygota s mutací c.437G>A způsobující aminokyselinovou záměnu p.S146N. Oba tito pacienti měli snížené hodnoty aktivit komplexů II, III a II-III.

3.5.3 COQ9

Gen COQ9 je jedním z příkladů velmi málo probádaných enzymů biosyntézy CoQ₁₀. Předpokládá se, že enzym katalyzuje některou ze závěrečných modifikací benzochinonového kruhu. Tomu napovídá analýza HPLC s elektrochemickou detekcí, která ukazuje hromadění blíže nepopsaného intermediátu (Duncan et al., 2009). Samotný gen leží na šestnáctém chromozomu (16q21). V sekvenci o 13 119 bp nacházíme 9 exonů. mRNA o délce 957 nukleotidů je přeložena do proteinu o délce 318 aa.

Doposud byl popsán jen jediný případ patogenní mutace v genu *COQ9* (Duncan et al., 2009).

3.5.3.1 Popsané mutace genu *COQ9* související s primární deficiencí koenzymu Q₁₀

Homozygotní mutace genu *COQ9* c.730C>T, která je zřejmě patologická a způsobuje vznik stop kodónu na 244. pozici vznikajícího proteinu (p.R244X), byla nalezena na základě sekvenční homologie s kvasinkovými geny účastnicími se biosyntézy CoQ (Duncan et al., 2009); (Johnson et al., 2005). Pacient trpěl únavou, křečovitými záchvaty, atrofií koncového mozku i mozečku, hypertrofií srdečních komor a selháním ledvin. Pacient měl sníženou koncentraci CoQ₁₀ ve svalu. Byla naměřena snížená aktivita komplexu II-III, ale aktivity komplexů II a III byly v normě. Po zahájení léčby v 11. měsíci věku (300 mg CoQ₁₀/den) se stav pacienta zlepšil. Pacient zemřel ve věku dvou let. Příčinou exitu bylo infekční onemocnění (Rahman et al., 2001). Řízená mutagenese daného nukleotidu u *S. cerevisiae* potvrdila, že respirační funkce jsou u mutantů omezeny, což se projevuje zastavením růstu. Starší sestra tohoto pacienta zemřela první den života.

3.5.4 *CABC1*

Gen *CABC1* (v průběhu vypracovávání diplomové práce začal být upřednostňován název ADCK3) kóduje kinázu 3 obsahující aarF-doménu (angl. aarF domain-containing kinase-3 gene). Jde o homolog kvasinkového genu *COQ8* a bakteriálního *UbiB*.

Gen *CABC1* se nachází na prvním chromozomu (1q42.13), protein kóduje 15 exonů, lokus má délku 25 352 bp resp. 47 309 bp v závislosti na exprimované variantě. První transkript je dlouhý 1 944 bazí, délka druhé mRNA dosahuje 2 932 bazí. Produkt genu *CABC1* je 647 aa velký protein.

Produkt genu kvasinkového genu *COQ8* se účastní přenosu elektronů na membráně a není příbuzný ABC transportním proteinům. Z fylogenetických studií vyplývá, že jde zřejmě o atypickou kinázu (příbuznou fosfoinositidovým kinázám a cholinové kináze). Její role tedy může být spíše nepřímá a regulační (Lagier-Tourenne et al., 2008). Exprese genu *CABC1* je závislá na proteinu p53 (Iiizumi et al., 2002). Diagnózou většiny pacientů s mutacemi v genu *CABC1* je ataxie spojená s atrofií mozečku (Lamperti et al., 2003), (Lagier-Tourenne et al., 2008), je ovšem popsáno hned několik případů pacientů, u nichž byla zjištěna snížená hladina CoQ₁₀ (Mollet et al., 2008).

Z popsaných případů známe čtyři pacienty, kteří nesli patogenní mutace v genu *CABC1*.

3.5.4.1 Popsané mutace genu *CABC1* související s primární deficiencí koenzymu Q₁₀

Z popsáných mutací v genu *CABC1* byla popsána homozygotní tranzice c.1651A>G, která způsobuje aminokyselinovou záměnu p.E551K (rs119468004). Pacient do jednoho roku dobře prospíval, začal chodit, nicméně jeho stav se začal rapidně zhoršovat. Ve dvou letech byla diagnostikována cerebelární ataxie, strabismus a záchvaty. Ve svalové biopsii byla naměřena snížená hodnota aktivity komplexu II-III. Suplementace pomocí CoQ₁₀ nevykazovala žádná zlepšení stavu. V 16 letech byla diagnostikována epilepsie (Mollet et al., 2008).

Dalším případem jsou dvě sestry nesoucí dvě heterozygotní mutace genu *CABC1*. Otcovská alela nese tranzici c.636C>T způsobující záměnu p.R213W (rs119468005), mateřská alela nese transverzi c.815G>T způsobující záměnu p.G272V (rs119468006). Obě pacientky se vyvíjely zhruba do dvou let zcela normálně, později se jejich vývoj začal zpomalovat, objevily se záchvaty a u obou pacientek se okolo 13. roku věku rozvinula cerebelární ataxie. Autoři naměřili zvýšený poměr aktivit komplexů IV/II-III a naopak snížený poměr aktivit komplexů II-III/II ve svalu a fibroblastech. Podávání CoQ₁₀ se jevilo jako neúspěšné.

Čtvrtý pacient studie byl složeným heterozygotem uvedené transverze c.815G>T (rs119468006) a jednobázové inserce G na pozici c.1812 zděděné po matce. Mutace c.636C>T a c.815G>T byly mezi 440 resp. 470 kontrolami nalezeny s incidencí 0,45% a 0,64% (Mollet et al., 2008). Klinický náález i v případě tohoto pacienta popisuje cerebelární syndrom a atrofii mozečku. Aktivity komplexů I-III a II-III byly ve svalu snižené, aktivity ostatních komplexů byly naopak zvýšeny (aktivita citrátsyntázy zůstala nezměněna), aktivity OXPHOS i koncentrace CoQ₁₀ ve fibroblastech byly v normě (Aure et al., 2004).

3.5.5 *APTX*

Gen *APTX* byl poprvé popsán jako člen rodiny enzymů s histidinovou triádou (HIT superfamily) (Kijas et al., 2006). Byl pojmenován aprataxin a spojován s ataxickými poruchami, okulomotorickou apraxií a hypoalbuminémií rozvíjejícími se ve velmi raném věku – EAOH z angl. early-onset ataxia with oculomotor apraxia and hypoalbuminemia (Date et al., 2001). Teprve později začaly být mutace genu *APTX* spojovány s deficiencí CoQ₁₀ (Quinzii et al., 2005). Ukázalo se však, že jeho hlavní funkcí bude oprava poškozené DNA. Svědčí o tom schopnost vazby na dsDNA, dsRNA i ssRNA, tak i schopnost asociace s proteiny účastnícími se oprav DNA - XRCC1 and XRCC4, vazebnými partnery DNA ligázy

III a IV (Ahel et al., 2006). Mutace *APTX* mají zřejmě za následek sekundární deficienci CoQ₁₀ (Quinzii et al., 2006).

Gen *APTX* leží na devátém chromozomu (9p13.3). Celý gen čítá 27 921 bp. Existují dvě sestřihové varianty. Varianta 1 je translatována z mRNA o délce 1 029 nukleotidů, vznikající protein je 342 aa dlouhý. Varianta 1 je zřejmě jaderně lokalizována a převažuje ve tkáních mozku, srdce, plic, jater a ledvin nad druhou kratší variantou (Moreira et al., 2001); (Sano et al., 2004). Varianta 2 je sestřižena do mRNA o délce 921 nukleotidů a vzniklý protein má délku 306 aa.

3.5.5.1 Popsané mutace genu *APTX* související se sníženou hladinou koenzymu Q₁₀

Moreira a kolektiv popsali jako první několik pacientů trpících EAOH poruchami, v jejichž tkáních byla snížena koncentrace CoQ₁₀ a identifikovali mutaci c.837G>A (rs104894103) v exonu 6, která znamená vznik stop kodónu na pozici 279 - p.W279X (Moreira et al., 2001). Stejnou mutaci popsala o dva roky později jiná studie nepříbuzné rodiny (Tranchant et al., 2003). A i další případy pacientů s rodinnou anamnézou EAOH nesli shodnou mutaci p.W279X (Musumeci et al., 2001); (Quinzii et al., 2006); (Le Ber et al., 2007). Deficience CoQ₁₀ jsou klinicky poměrně heterogenní. Závažnost postižení těchto pacientů většinou nijak nekoreluje se stanovenou hladinou CoQ₁₀. Léčba orálním podáváním CoQ₁₀ má většinou benefiční účinky.

3.6 Možnosti studia deficience koenzymu Q₁₀ in vitro

Primární deficience CoQ₁₀ je velmi vzácné onemocnění. Od roku 1989, kdy byl popsán první případ tohoto onemocnění (Ogasahara et al., 1989), bylo dosud popsáno zhruba 20 případů, které jsou potvrzeny na molekulární úrovni – tedy je známa patogenní mutace genu, který se účastní biosyntézy CoQ₁₀. Je nutné poznamenat, že naopak sekundární deficience, příp. deficience z dosud neobjasněných příčin, jsou poměrně běžné. Pro studium tohoto vzácného onemocnění se zdá být vhodným přístupem vytvoření modelu deficience CoQ₁₀ *in vitro*. Pro pochopení patologických efektů na úrovni buňky je nezbytná důkladná charakterizace takového modelu.

Již v 70. letech byla popsána inhibice produktu genu *COQ2*, 4-hydroxybenzoát polyprenyltransferázy (Coq2p), pomocí dvou derivátů kyseliny benzoové - 4-aminobenzoové kyseliny (*p*-aminobenzoová kyselina; PABA) a 4-chlorbenzoové kyseliny (PCBA) (Alam et

al., 1975). Bylo pozorováno, že ačkoli působení těchto derivátů *in vivo* nemá na koncentraci CoQ₁₀ ve tkáních vliv, u tkáňových kultur se hladina CoQ₁₀ signifikantně snižuje. Můžeme tedy hovořit o modelu deficiencie CoQ₁₀ *in vitro* na kultivovaných buňkách, který umožňuje další studium této poruchy. Později byla testována řada dalších inhibitorů biosyntézy CoQ₁₀. Snaha charakterizovat intermediáty biosyntézy CoQ₁₀ byla ale neúspěšná. Použité inhibitory různých kroků biosyntézy neměly významnější efekt. Inhibitor skvalensyntázy, YM-6330l, způsobil zastavení produkce cholesterolu, nicméně biosyntéza CoQ₁₀ pokračovala beze změn. Snížení hladiny cholesterolu vykazovaly do jisté míry i nespecifické inhibitory cytochromu P450 – ketokonazol, SKF525, benzylimidazol, metyrapon a ellipticin – nebo inhibitory methylace - *S*-adenosyl-L-homocystein a ethionin. Žádný z nich ale biosyntézu CoQ₁₀ neovlivňoval (Tekle et al., 2008).

3.6.1 Inhibice biosyntézy koenzymu Q₁₀ prostřednictvím 4-aminoderivátů kyseliny benzoové

Inhibice pomocí PABA i PCBA má kompetitivní charakter. Po navázání PABA na Coq2p dokonce vzniká prenylovaný intermediát. V případě PCBA nebyla prenylace zaznamenána. Podobný mechanismus inhibice se dá očekávat i 4-nitrobenzoové kyseliny (Forsman, Sjöberg et al. 2010)

Byla provedena modelová studie deficiencie CoQ₁₀ inhibicí Coq2p pomocí PABA. Autoři tento model aplikovali na leukemickou linii buněk HL-60 (Gonzalez-Aragon et al., 2005).

Duberley et al. (2010) vytvořili model deficiencie CoQ₁₀ na buňkách neuroblastomu (SHSY-5Y). Snažili se modelovat deficienci CoQ₁₀ z pohledu encefalopatie prostřednictvím inhibice Coq2p pomocí PABA.

3.6.1.1 Kyselina 4-aminobenzoová

Kyselina 4-aminobenzoová (PABA) je derivátem benzoové kyseliny. Strukturně se podobá prekursoru benzochinonového kruhu – kyselině 4-hydroxybenzoové (Alam et al., 1975). V humánní medicíně má stálé místo. Často je označována jako vitamín Bx. Na trhu je k dostání i ve formě tablet. Není ale vitamínem v pravém smyslu. PABA slouží jako meziprodukt metabolismu esenciální kyseliny listové, kterou syntetizuje např. *E. coli* ve střevní mikroflóře. Nicméně samotný lidský organismus není schopen PABA metabolizovat.

PABA byla používána jako složka opalovacích krémů. Je schopna pronikat kůží a zvyšuje riziko tvorby thimidinových dimerů v DNA buněk pokožky a tím i riziko vzniku rakoviny kůže (Osgood et al., 1982). Proto se v současné době již jako ochrana před UV paprsky nepoužívá.

3.7 *Pacienti s důvodným podezřením na primární deficienci koenzymu Q₁₀*

V Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch na Klinice dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK a VFN Praha, bylo na základě klinických a biochemických nálezů vybráno původně dvanáct pacientů s podezřením na primární deficienci CoQ₁₀. Klinický obraz souboru pacientů a aktivity stanovovaných enzymů jsou shrnuty v tabulkách (Tabulka 4 a Tabulka 13 v příloze). Koncentrace CoQ₁₀ ve svalu je mezi pacienty variabilní. Pohybuje se mezi 30 a 70 % spodní hranice kontrolního rozmezí pro danou věkovou skupinu.

Tabulka 3: Koncentrace koenzymu Q₁₀ ve vzorku svalu pacientů s podezřením na primární deficienci koenzymu Q₁₀.

Pacient	Věk	CoQ ₁₀ (pmol.mg ⁻¹)	CS (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	CoQ ₁₀ /CS
P1	16l	96	111	0,87
P2	8m	50	46	1,09
P2*	19m	95	76	1,26
P3	11m	121	153	0,8
P4	1m	97	90	1,08
P5	22l	63	71	0,89
P6	15m	88	134	0,66
P7	20m	50	92	1,09
P8	5m	120	196	0,61
P9	18m	0	33	0
P11	5l	159	149	1,07
P11	5l	95	-	-
P12	17l	49	66	0,76
ref. rozmezí n = 10	< 2l	180-460	70-120	1,6-2,9
ref. rozmezí n = 15	> 2l	160-280	70-120	1,5-3,1

* - stav po stimulaci podáváním koenzymu Q₁₀

... Tabulka 3, pokračování:

l/m - roky/měsíce

n - počet zdravých kontrol v referenčním souboru

- - nestanoveno

CS - citrátsyntáza

Tabulka 4: Aktivity mitochondriálních enzymů ve svalové tkáni u pacientů s podezřením na deficienci koenzymu Q₁₀

enzym	aktivita komplexu dýchacího řetězce a citrátsyntázy															
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P11	P12					
I	bpn	-	bpn	↓↓↓	bpn	↓	↓↓	↓↓	↓	bpn	-					
II		bpn		bpn		bpn	bpn	bpn	bpn		-	bpn				
III					↓↓					bpn	bpn		↓			
I-III					↓↓					-	-		↓↓	-		
II-III					↓↓↓					bpn	bpn		↓	↓↓↓	bpn	
IV					↓					↓	↓↓		↓	↓↓		
CS					↓					↓↓	bpn		↓	↓	bpn	bpn
IV/CS					bpn					bpn	bpn		bpn	bpn	↓	↓↓

P - pacient

I - NADH:koenzym Q₁₀ reduktáza

II - sukcinát:koenzym Q reduktáza

III - ubichinol:cytochrom *c* reduktáza

I-III - NADH:cytochrom *c* reduktáza

II-III - sukcinát:cytochrom *c* reduktáza

IV - cytochrom *c* oxidáza

CS - citrátsyntáza

bpn - bez patologického nálezu

↓ - hodnota je snížena, pohybuje se mezi 80 a 100 % spodní hranice referenčního rozmezí

↓↓ - hodnota je signifikantně snížena (blíží se 50 % spodní hranice ref. rozmezí)

↓↓↓ - hodnota je velmi významně snížena (méně než 50 % spodní hranice ref. rozmezí)

- - nestanoveno

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro první cíl byla použita genomická DNA (gDNA) zdravých kontrol, která byla k dispozici v laboratoři.

Pro druhý cíl byla použita gDNA dvanácti pacientů s vysloveným podezřením na primární deficienci CoQ₁₀ (P1-P12). V průběhu testování byly vzorky pacienta 10 analyzovány a vzhledem k potvrzení jiné diagnózy byl z dalších molekulárně diagnostických analýz deficiencie CoQ₁₀ vyrazen. Z tohoto důvodu jsou dostupná pouze data týkající se genů *PDSS1* a *APTX*.

Pro třetí cíl byly použity tři kultury lidských kontrolních fibroblastů (HSF1 – HSF3). Kultury HSF1 a HSF2 pocházejí z biopsie pacientů ve věku do 10 let, kultura HSF3 pochází z biopsie dospělého pacienta. Pro aplikaci modelu deficiencie na immortalizovanou linii buněk byla použita linie HEK293 (CRL-1573) firmy ATCC (Rockville, USA).

Seznam použitých přístrojů, chemikálií a roztoků viz Přílohy (str. 80).

4.2 Metody

4.2.1 Molekulárně-genetické analýzy

4.2.1.1 Optimalizace PCR reakcí

Specifické primery pro amplifikaci kódujících sekvencí byly navrhovány tak, aby fragmenty kromě kódující sekvence obsahovaly také přilehlé intronní úseky, které hrají zásadní roli při sestřihu mRNA. Pro usnadnění navrhování primerů byl použit program Primer3 v.0.4.0. (Rozen, 2000). Optimalizace produktů spočívala v přípravě osmi reakcí v gradientu teplot nasedání primerů mezi 50 – 67 °C. event. s přidavkem aditiv. U reakcí optimalizovaných pro metodu HRM je důležité, aby vznikl specificky jen jediný fragment o délce 150 – 500 bp.

4.2.1.2 High Resolution Melting Analysis

Fragmenty DNA byly připraveny dle protokolů v tabulce (Tabulka 6), do 25 μl směsi bylo přidáno 2,5 μl fluorescenčního barviva LCGreen[®]. Program PCR reakce zůstal stejný jako v tabulce (Tabulka 6). Připravené vzorky byly rozpipetovány do 96jamkové destičky

v dubletu po 10 μl a převrstveny 15 μl minerálního oleje. Celá destička byla centrifugována při 2 000 RCF a 4 °C po 3 min. Snímání změn intenzity fluorescence probíhalo na LightScanneru v rozmezí teplot 65 – 98 °C. Vyhodnocení měření probíhalo pomocí softwaru výrobce (IdahoTech, USA).

4.2.1.3 Sekvenování genů

Kódující oblasti genů *PDSS1* (NC_000010.10 26986595..27035727), *PDSS2* (NC_000006.11 107473761..107780779, complement), *COQ2* (NC_000004.11 84184977..84206067, complement), *COQ9* (NC_000016.9 57481349..57495187), *APTX* (NC_000009.11 32972608..33001626, complement) a *CABC1* (NC_000001.10 227084589..227091365) byly amplifikovány pomocí specifických primerů (viz Tabulka 5). Reakční směsi se skládaly vždy z 12,5 μl daného roztoku Master MIX, 1 μl roztoku páru primerů o koncentraci 10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, 50 ng templátové DNA (není-li uvedeno jinak), aditiv (dle tabulky - Tabulka 6) a vody do konečného objemu 25 μl . PCR reakce byla odstartována denaturací při 95 °C po dobu 2 min. Následovaly cykly – denaturace 94 °C po dobu 1 min, nasedání primerů při specifické teplotě po dobu 30 s (není-li uvedeno jinak) a polymerace při 72 °C po dobu 30 s. Počet cyklů a případné modifikace PCR reakcí jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6). Reakce byly zakončeny elongací při 72 °C po dobu 7 min.

PCR produkty byly rozděleny na horizontální elektroforéze v 1,5% agarózovém gelu v TBE pufru. Molekulová hmotnost byla odečtena dle markeru 100bp DNA Ladder (Fermentas). Fragmenty byly barveny ethidiumbromidem a pod UV světlem vyříznuty z gelu. Produkty byly z gelu extrahovány kitem Wizard SV Gel and PCR Clean-UP (Promega) dle návodu výrobce. Vzorky fragmentů připravených pro metodu HRM byly pro účely sekvenování přečištěny po analýze stejným kitem bez předchozí separace v agarózovém gelu.

Koncentrace DNA byla stanovena na spektrofotometru ND-1000 NanoDrop.

Sekvenační PCR reakční směsi byly připraveny z 20-30 ng PCR fragmentu, 1,5 μl primeru (F, nebo R o koncentraci 3,2 $\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), 2 μl směsi Ready Reaction Mix, 3 μl pufru 5x Sequencing Buffer z kitu Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) a vody do konečného objemu 20 μl . Postup byl dodržen dle protokolu výrobce. Čištění bylo provedeno ethanolovou precipitací dle výrobcem doporučeného protokolu. Finální denaturace byla provedena 20 μl formamidu na reakci, zahřátím směsi na teplotu 95 °C po dobu 3 min a následným prudkým zchlazením na pokojovou teplotu. Pro sekvenaci byly použity sekvenátory firmy Applied Biosystems (viz Přílohy, Použité přístroje), kapiláry

50cm/80cm. PCR produkty byly sekvenovány v obou směrech. K analýze byly použity programy BioEdit v7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, USA) a SeqScape V2.5 (Applied Biosystems, USA).

Tabulka 5: Sekvence specifických primerů

GEN	FR.	DÉLKA (bp)	FORWARD PRIMER (ve směru 5' → 3')	REVERSE PRIMER (ve směru 5' → 3')
PDSS1	1	387	GGGCAGACACCCGAAGT	CCGCTCCCATTTCATTCC
	2	277	CTGTAAAGCCCCTTCGTTTTG	TATCGTTCTGCCCCTTGCT
	3	303	CCTGTAAATGGGTGATTAGAAGATAA	GCCAGCAGTTCAGACCA
	4	529	GTTTAGTTTTCTTTGATTTTGTTG	ATGAACCTGGGAGGCAAG
	5*	415	AGCGAACTCCGTCTCAAAA	AGGCTGGTCTCAAACTCCTG
		328	CTGTTGGCTTTCTGTGCAGTT	TGCTGGGATTATAGGCATGAG
	6	352	GAAATGGCTGTGTGGTGAA	GGTCCGAAAAGTGTGTGATT
	7-8	495	TGGCTCTACTGCTCTGATGG	CCTCTTGGGATTTTGGGTA
	9-10	500	GCTTTGTTGCTGCCTGG	ATGCCTTCCCATCTATTCTT
	11	452	CTCCTCCCATACACCACCAC	GAGTTTTCCCTTCTCAGTTTTTGTC
	12	387	GAGTCGGGAAAAGAACATTAGAG	TCTGCACATGAAGCAAACAA
PDSS2	1	441	RP-TGCCCCTGGTTTGT	T7-AATGAGTGCTAGTGTGT
	2	387	RP-ATTTTCTCCTGACCCTGT	T7-GGTGATTCCACTGACCTCTG
	3	418	RP-GGGGGCAACCTCTGGAA	T7-CCGGGCACACAGACCT
	4	312	RP-TCTTGGTGCATAGTCCATTT	T7-TGACATTTTCGTTATTCTAGTTGTACC
	5	410	RP-GGCATCTTTAGTTCTGTCTTGT	T7-AGGTTTCTTGTGTGTCGTTTTA
	6	512	RP-AGCCTCCCAAAGTCTGA	T7-AAAAACGAAGATTACAAAGAAAGGA
	7	239	RP-AGAGGGAAAGGGGACAGAG	T7-AACGAAAGCCAAACACCAAA
	8	563	RP-GGAGCACAGACACCAAGCA	T7-GTAGCAGTTCCAAAAGAAAAGCA
COQ2	1Fa	252	CACGGTGGTGACTTGACAG	TTTCAGGTTCTCATTTCATCA
	1F	387	GGAAAGGTTCTGCCACAC	GCCCGCACTCACCAAT
	2	382	TTCTTTATTTCTTTGGTATGTGATG	CATGCTGGATTTCTGTGGT
	3	431	GTTCTTTGTTTTGTTTGTTAGAG	TCATTTTATTCCTATTTTCTCCATTT
	4	207	TCGTGGTTTCTAAGAGGTAGTGG	ATCTCTCCATAAAAGTGTAGTTTGC
	5	317	GAAGGAACCCACAGAAAGCA	AAAAACAGCAACAACCTAAACCAAAG
	6	416	TGAAAGTAGTTAGTGGTAATTGGTTG	TGCCAGGTAACACAGAGG
COQ9	7	373	GCTGTTTTCTCCTCCGTGTT	GCTCTAAATCTTCATCTTCAGGTTT
	1	375	CCCCACCACTCTCACCTG	CTTCACCTCACCTTGCTCGT
	2	500	AAGTGGTAGAAACAGGTCAAGATG	AAAAGGGGATGGAGAGGAG
	3	307	CAGAGCCCCAGTTTCTGGTC	GACTGGAAGAAGGCATGAGG
	4	294	TACACTTGGGCACCGCTTT	TGCTCTCTTGGGTTCTGCT
	5	232	GGGCTGAGTAAACCGTGAG	TGAGTGAAAGGTGCTGAGAATG
	6	371	CTTGGAGAGGTAGATGCTGGT	CTGGTCCCTGAATGAAGATG
	7	470	TTTGAGATGGTAGTGTGTCCAG	AAGTGTGGCTCTTAGGGAAGG
	8	150	AACTTTGTGTTGGTGGCCTAA	AGCCGGAATGGGAGAGAG
APTX	9	222	CCAACATAGCAAAACCTGTC	TTCAATCTGTCCGCTCATTCT
	1	375	ATCTGGGAAGTGGGCAAG	GTGAACAAACGCAAAGTGG
	2	331	CACCTCCTTCCTCCCAATCT	TCCTGTGTATCTTGTGCCATTCT
	3	556	GATTCAGGCAGGGAGGTAAA	CACATTGGGAGGGCAGA
	4	237	TGCCTGGTTCTTTGTTGC	CACCTTGCCTTATGTTACC
	5	518	TGAACATAAGGCAAGGTGCT	TAACCCCTCACGCATTCTG
	6	299	GGCAATGGAGTGAAGCAG	CCTCTGTGGAGTGGTCATTT
	7	451	ACAACCAGGCACACAGAAGA	GTCAGGCAGAGAGGTGGAAG
	8	575	CAGAGGCTTTTCCATTTTG	CCCCCAAGAAGACAACCTCAC
	9	283	TTTTGGTATCTCATATTGGTTTTCC	CAGAATAGGTGCCAGCAGTTT

... pokračování Tabulky 5

CABC1	2	445	AGTGGAAAAACCAGCCCTCT	AGGACCGTGGGACACATTAG
	3	518	GCTCGCTCTTGCTCTCCTAA	AGCCCAAGGCCATCACT
	4	203	GTGGGGTGGAGAGGAGATG	GGGCAGGTGAGGCAGTC
	5	321	ACCTTGTTCCCACTTTTCA	CTGACACTCCCAGAGCACA
	6	290	CCATCCCACTCCCAGACC	GCTCACATCTTGCCCACTGA
	7	296	GGGCTCCTGTCTTTCTGG	CCAAGTCTGTCCCCTCCAC
	8	465	GGCTCTGCCCCTCTCTGT	TCTGTGCCCCCAAAGTCA
	9-10	450	GGCTAACTCCCCTGCCTCA	TGCAACCCCAGCCCTCT
	11	359	GCCCTCTGCCTGGTTGG	TGCTACTTCACTGCCCCTCA
	12	357	GGTAGGGTGGGTAAAACAGGA	CAACAGAGGGCAGTGAGGA
	13	386	ATCCTCACTGCCCTCTGTTG	ACCCACCCCTCATCTCTC
	14	300	GTCCCCTCCTGTGCCTCT	CTCGGAAAATCTCACGCTCA
	15	305	CCGCCATTATCCTTCTCT	GCCTGCCTCTTGCACTAGT

* - „nested“ PCR

RP - AGGAAACAGCTATGAC

T7 - AATACGACTCACTATAG

Tabulka 6: Složení PCR směsí a podmínky PCR reakcí

GEN	FR.	MIX	ADITIVA	T _{NASEDÁNÍ PRIMERŮ} (°C)	POČET CYKLŮ	POZNÁMKA
PDSS1	1	Combi	5% DMSO	60,1	30	
	2	Plain PP		64,3	35	HRM
	3	Combi		65,7	38	
	4	Combi		65,7	38	
	5*	I. Combi	10% DMSO	57,2	30	Extenze 20s
		II. Combi	10% DMSO	57,2	30	Místo 50 ng DNA 2 μl I. reakční směsi ; extenze 20 s
	6	Plain PP		64,3	35	HRM
	7-8	Plain PP		64,3	35	HRM
	9-10	Pl Combi	2 % DMSO	64,3	35	
	11	Pl Combi	2 % DMSO	67	35	
	12	Plain PP		54,7	35	HRM
PDSS2	1	Combi		58	28	
	2	Combi		58	28	
	3	Combi		58	28	
	4	Combi		58	28	
	5	Combi		58	28	
	6	Combi		58	28	
	7	Combi		58	28	
	8	Combi		58	28	
COQ2	1Fa	PPP	10 % DMSO 25 nmol MgCl ₂	57,2	35	Extenze 15 s
	1F	Combi	5 % DMSO	62,5	30	
	2	PPP	5 % DMSO	57,2	30	
	3	Plain PP	LCGreen	54,7	30	HRM
	4	Plain PP	LCGreen	54,7	30	HRM
	5	PPP	5% DMSO	57,2	30	
	6	Plain PP	LCGreen	54,7	30	HRM
	7	Plain PP	LCGreen	54,7	30	HRM

... pokračování Tabulky 6						
COQ9	1	Combi	5 % DMSO	64,2	40	
	2	Plain PP		65,7	35	HRM
	3	Plain PP		65,7	35	HRM
	4	Plain PP		62,5	35	HRM
	5	Plain PP		62,5	35	HRM
	6	Plain PP		62,5	35	HRM
	7	Plain PP		62,5	35	HRM
	8	Plain PP		62,5	35	HRM
	9	Plain PP		65,7	30	sekvenace jen R-směru
APTX	1	Plain PP	LCGreen	65,7	35	HRM
	2	Plain PP	LCGreen	65,7	35	HRM
	3	Pl Combi	LCGreen	65,7	35	HRM
	4	Plain PP	LCGreen	62,5	35	HRM
	5	Plain PP	LCGreen	62,5	35	HRM
	6	Combi	5 % DMSO	62,5	40	sekvenace jen R-směru
	7	Plain PP	LCGreen	65,7	35	HRM
	8	Combi	5 % DMSO	62,5	35	
	9	Plain PP	LCGreen	62,5	30	HRM
CABC1	2	Combi		64,3	40	
	3	Plain PP	LCGreen	64,3	35	HRM
	4	Plain PP	LCGreen	67	35	HRM
	5	Plain PP	LCGreen	64,3	35	HRM
	6	Plain PP	LCGreen	67	35	HRM
	7	Plain PP	LCGreen	67	35	HRM
	8	Plain PP	LCGreen	67	35	HRM
	9-10	Combi	5% DMSO	64,3	40	
	11	Plain PP	LCGreen	64,3	35	HRM
	12	Plain PP	LCGreen	64,3	35	HRM
	13	Plain PP	LCGreen	64,3	30	HRM
	14	Plain PP	LCGreen	64,3	30	HRM
	15	Plain PP	LCGreen	54,7	30	HRM

* - „nested“ PCR

HRM - High Resolution Melting Analysis

LCGreen - 2,5 µl LCGreen® v PCR reakci

PPP/Plain PP/Combi/Pl Combi

- typ Master mixu, TopBio, ČR (viz Přílohy, Roztoky)

sekvenace jen R-směru

- jelikož navržený fragment obsahoval na začátku sekvence polyN sekvenci a jednotlivé alely genu pacienta byly tvořeny nestejným počtem opakování nukleotidu N, ve směru forward primeru nebyl elektroforeogram čitelný; fragment byl sekvenován pouze s reverse primerem v sekvenační reakci

4.2.2 Analýzy modelu deficiencie koenzymu Q₁₀ *in vitro*

4.2.2.1 Kultivace fibroblastů při zátěži 4-aminobenzoovou kyselinou

Fibroblasty HSF1 – HSF3 a buňky HEK293 byly kultivovány v médiu Quantum 333 for Fibroblasts (PAA, Rakousko) při 37 °C a 5% atmosféře CO₂ ve vzduchu. Bylo připraveno

médium s PABA o koncentraci 1 mM rozpuštěním krystalické PABA přímo v médiu. Fibroblasty byly při pasáži převedeny do média s PABA. Kultivace pro první stanovení probíhala dva, čtyři a osm dní. Další analýzy byly prováděny vždy po čtyřdenní kultivaci. Konfluence dosahovala minimálně 80%. Paralelně s kultivací buněk v médiu s PABA bylo kultivováno shodné množství buněk z každé kultury v čistém médiu bez přídavku PABA. Tyto buňky byly použity jako kontrolní vzorek.

4.2.2.2 Sklizení buněk

Kultivační médium bylo odstraněno z kultivační lahve a buňky byly omyty PBS. Poté bylo do lahve přidáno cca 10 ml ledového PBS a buňky byly seškrábnuty buněčnou škrabkou. Suspenze v PBS byla přenesena do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 min při 710 RCF a 25 °C. Supernatant byl odsát a peleta byla ještě dvakrát promyta 10 ml ledového PBS a znovu centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl odsát a suchá peleta buněk byla zamražena v -80 °C.

4.2.2.3 Vitální barvení buněk

Buňky byly z kultivační lahve přeneseny na krycí skla umístěná v jamkách kultivační destičky. Kultivovány byly po 4 dny v médiu s PABA (viz 4.2.2.1). Poté byly dvakrát omyty PBS a inkubovány v roztoku příslušného fluorescenčního barviva. Fotografie buněk byly pořízeny po přenesení skla do Hankova média pomocí fluorescenčního mikroskopu DIAPHOT 200 (Nikon, Japonsko) při zvětšení 100x, 200x a 600x. Snímky byly pořízeny pomocí CCD kamery Olympus DP50 při automatickém nastavení softwaru ViewFinder 3.0.1 (Pixera Corp., USA) včetně expozičního času, není-li uvedeno jinak (viz 4.2.2.3.3 a 4.2.2.3.4).

4.2.2.3.1 Viabilita

Viabilita buněk byla ověřena pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells (Invitrogen, USA). Barvení bylo optimalizováno na 0,5µM EthD-1 a 1µM Calcein AM v PBS. Inkubace probíhala dle návodu výrobce 30 min v pokojové teplotě.

4.2.2.3.2 Morfologie mitochondriální sítě

Mitochondriální síť byla značena fluorescenční sondou MitoTracker CMX RossTM o koncentraci $10 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ média. Inkubace probíhala 10 min při teplotě 37 °C. Snímky byly pořízeny při automatickém nastavení expozičního času.

4.2.2.3.3 Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích

Přítomnost superoxidových radikálů v mitochondriích byla detekována pomocí fluorescenční sondy MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator o koncentraci $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v PBS. Buňky byly inkubovány 10 min při 37 °C. Snímky byly pořízeny při manuálním nastavení softwaru ViewFinder s konstantní expozicí (uvedena v popisu daného snímku).

4.2.2.3.4 Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v rámci celé buňky

Cytoplazmatické superoxidové radikály v kultivovaných fibroblastech byly detekovány pomocí dihydroethidia (DHE) o koncentraci $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v PBS. Inkubace trvala 30 min v 37 °C. V případě HEK293 buněk byla použita koncentrace $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a inkubace 10 min v 37 °C. Snímky byly pořízeny při manuálním nastavení softwaru ViewFinder s konstantní expozicí (uvedena v popisu daného snímku).

4.2.2.3.5 Transmisní elektronová mikroskopie

Fibroblasty byly fixovány dle modifikované metody (Luft, 1956). Fixace proběhla v 2% roztoku manganistanu draselného v PBS po dobu 15 min. Buňky byly opláchnuty PBS a dehydratovány vzrůstající ethanolovou řadou. V Laboratoři elektronové mikroskopie Ústavu patologie VFN Praha a 1. lékařské fakulty UK v Praze byly připraveny preparáty pro elektronovou mikroskopii - buňky byly zality do nosiče, na mikrotomu byly připraveny ultratenké řezy o tloušťce 60–90 nm a připravené řezy byly obarveny citrátem olovnatým a octanem uranylu.

Fotografie byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu JEM-1200Ex (JEOL, Japonsko) ve zvětšení 25 000x a 40 000x.

4.2.3 Biochemické analýzy

4.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinů

4.2.3.1.1 Lowryho stanovení

Koncentrace proteinů ve vzorcích v částech 4.2.3.2, 4.2.3.8.1 a 4.2.3.8.2 byla stanovena dle standardního protokolu (Lowry et al., 1951).

4.2.3.1.2 Stanovení dle Bradfordové

Koncentrace proteinů ve vzorcích v části 4.2.3.6 byla stanovena dle standardního protokolu (Bradford, 1976).

4.2.3.2 Příprava vzorků pro měření vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

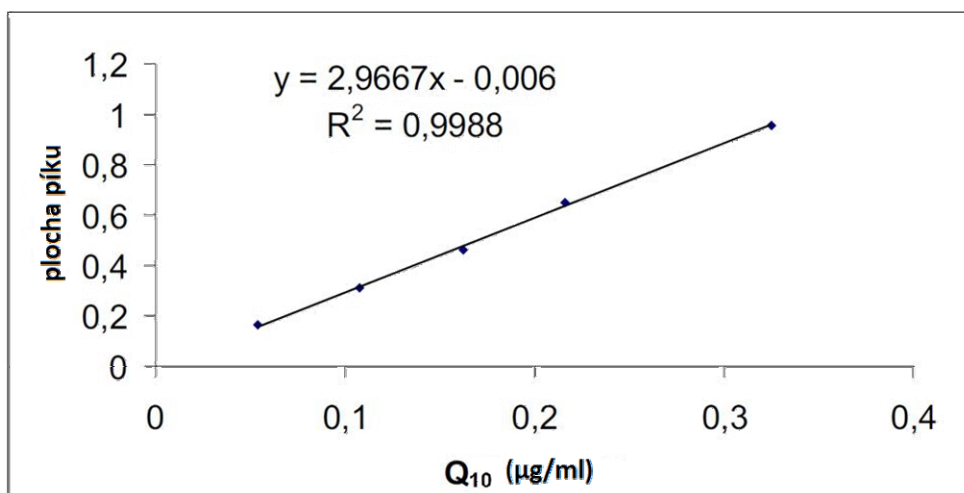
Příprava vzorků byla provedena v dubletu. Zamražená peleta buněk byla resuspendována ve STE izolačním roztoku. Suspenze byla přenesena do homogenizátoru (typ Dounce, sklo/sklo; 0,1 ml) a postupně důkladně homogenizována na ledu po dobu 40 s. Ke 200 μl homogenátu o koncentraci proteinů minimálně 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přidáno 50 μl 1,4-benzochinonu o koncentraci 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pokud byl objem vzorku menší než 200 μl , vzorek byl zředěn vodou do objemu 200 μl . Vzorek byl promíchán na vortexu po dobu 10 s a ponechán 10 min stát. Poté byl ke vzorku přidán 1 ml propan-1-olu a vše bylo promícháno 10 s na vortexu. Vzorky byly centrifugovány po dobu 20 minut při 26 384 RCF a 4 °C. Supernatant byl použit pro analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (Mosca et al., 2002)

4.2.3.3 Příprava kalibrační křivky pro měření koncentrace koenzymu Q₁₀

Standardní roztok koenzymu Q₁₀ (TANAKA, koncentrace 39,39 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) byl použit pro přípravu pracovního roztoku CoQ₁₀. 33 μl standardního roztoku bylo rozpuštěno v 1967 μl směsi propan-1-ol:voda v poměru 5:1. Kalibrační přímka o pěti bodech byla sestavena ředěním pracovního roztoku CoQ₁₀ dle tabulky (viz Tabulka 7).

Tabulka 7: Ředění vzorků pro přípravu kalibrační křivky pro měření koenzymu Q₁₀ pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

	Pracovní roztok CoQ ₁₀ (μl)	Směs propan-1-ol:voda (μl)	Ředění	Koncentrace CoQ ₁₀ (μg.ml ⁻¹)
A	600	600	2x	0,325
B	400	800	3x	0,216
C	300	900	4x	0,1625
D	200	1000	6x	0,108
E	100	1100	12x	0,0541



Graf 1: Kalibrační přímka pro měření koncentrace koenzymu Q₁₀.

4.2.3.4 Měření koncentrace koenzymu Q₁₀

Měření koncentrace koenzymu Q₁₀ bylo provedeno pomocí HPLC Pharmacia, v systému 200 μl smyčka, kolona Supelcosil LC 18 (Supelco) 25 cm x 0,46 cm i.d. 5 cm, předkolona LC 18S, 2 cm (Supelco). In line filtr A-701 (Upchurch Scientific, Inc., Oak Harbor, WA, USA) byl umístěn mezi injektor a předkolonu. Mobilní fáze byla tvořena směsí ethanol:methanol v poměru 70:30 s průtokem 1ml/min. Detekce UV byla provedena při vlnové délce 275 nm. Získaná data byla zpracována v programu MS Office Excell.

4.2.3.5 Příprava vzorků pro SDS-elektroforézu

Suché peletky kultivovaných fibroblastů a HEK293 buněk byly resuspendovány v RIPA pufru a ponechány na ledu. V průběhu následujících 20 minut byly třikrát vortexovány. Dále byly suspenze centrifugovány při 4 °C, 51 000 RCF, 20 min. K nanáše 30 μg proteinu byl

přidán vzorkový pufr s β -merkapt ethanolom v poměru 3:1. Inkubace probíhala 30 min při 37 °C.

4.2.3.6 SDS-elektroforéza

Připravené vzorky (dle 4.2.3.5) byly rozděleny na 4% zaostřovacím a 12% separačním polyakrylamidovém gelu. Jako markeru bylo použito 5 μ l SeeBlue Plus2 (Invitrogen). Napětí dosahovalo 40 V v zaostřovacím gelu a 100 V v separačním gelu.

4.2.3.7 Semi-dry western blot

PVDF membrána byla aktivována ponořením na 15 s do methanolu, následovalo ponoření do vody po dobu 3 min a přenesení do transferového pufru na 10 min. Byl sestaven standardní blotovací sendvič a na aktivovanou membránu byly přeneseny separované proteiny z polyakrylamidového gelu. Přenos proběhl na blotovací aparatuře Tex77SemiDry Blotter (Hoefer) dle pokynů výrobce za konstatního napětí a proudu ($I_{mA} = S_{membrány} [cm^2] \cdot 0,7$) po dobu 1 hodiny. Po rozebrání blotovacího sendviče byl gel barven přes noc v barvicím roztoku a druhý den při 60 °C vysušen. Membrána byla po blotování 2 h blokována v 5% mléce v 50 ml TBS v pokojové teplotě. Po promytí (3 x 5 min v TBS) byla inkubována 2 h s primární protilátkou (viz Tabulka 8). Následovalo promytí (3 x 5 min v TBST pufru) a další inkubace - 1 h se sekundární protilátkou. Dále byla membrána dvakrát promyta v TBST pufru (po 5 min) a jednou v TBS pufru (5 min). Vizualizace proběhla pomocí SuperSignal WestFemto Sensitivity Substrate (ThermoScientific) a zobrazovacího systému VersaDoc 4000 (BioRad).

4.2.3.8 Měření aktivit komplexů dýchacího řetězce

4.2.3.8.1 Izolace mitochondriální frakce

Buňky byly kultivovány dle (4.2.2.1). Pelety buněk HSF byly sklizeny z 11 x 75 cm² kultivační plochy o konfluenci minimálně 90 %. Pelety buněk HEK293 byly sklizeny z 6 x 75 cm² kultivační plochy o konfluenci minimálně 90 %. Pelety byly resuspendovány v 10 ml STE izolačního roztoku v přidavkem 1% koktejlu inhibitorů proteáz těsně před použitím. Suspenze byla po 1 ml přenášena do skleněného homogenizátoru (Dounce, sklo/sklo, 1 ml) a postupně homogenizována po dobu 90 s na ledu. Homogenát byl přenesen do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugován (15 min, 600 RCF, 4 °C). Supernatant

obsahující mitochondrie byl přenesen do 1,5ml mikrokumavek a centrifugován (25 min, 10 000 RCF, 4 °C). Supernatant s cytosolickou frakcí byl uchován v -80 °C pro případné další analýzy, peleta mitochondrií byla resuspendována ve 100 µl STE izolačního roztoku a spojena do mikrokumavek po 500 µl suspenze. Centrifugace probíhala shodně 25 min, 10 000 RCF, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety resuspendovány v 30 µl STE izolačního roztoku. Izolované mitochondriální frakce byly skladovány při -80 °C.

Tabulka 8: Ředění primárních myších (králíčních) protilátek

primární protilátka	ředění v 2% mléce v TBST	komplex OXPHOS
anti-NDUFB6	1 : 3 143	I
anti-SDH-70kDa	1 : 36 666	II
anti-Core2	1 : 18 333	III
anti-Core1	1 : 11 000	III
anti-Cox2	1 : 8 800	IV
anti-CoxVa	1 : 3 143	IV
anti-ATP- α	1 : 8 000	V
anti- α -tubulin (R)	1 : 1 250	-

(R) – králíčí primární protilátka
(MitoSciences, USA)

4.2.3.8.2 Stanovení aktivity komplexů dýchacího řetězce a citrátsyntázy

Pro enzymologická měření byly použity izolované mitochondrie z kultivovaných fibroblastů nebo HEK293 buněk. Připravené reakční směsi byly vytemperovány na 37 °C. Aktivita byla měřena v kyvetách o objemu 1 ml a optické dráze 1 cm. Měření probíhalo na spektrofotometru UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko).

$$\text{Specifická aktivita byla vypočtena dle vzorce } SA = \frac{dA \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot v \cdot c};$$

dA – aritmetický průměr naměřených hodnot absorbance [min^{-1}], ε - molární absorpční koeficient [$10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$] – hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedeny níže, v - objem vzorku [μl], c – koncentrace proteinu ve vzorku [$\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$], SA – specifická aktivita [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$].

4.2.3.8.3 Spektrofotometrické měření aktivity komplexu I

Specifická aktivita komplexu I byla stanovena na základě měření absorbance ubývajícího redukovaného NADH při 340 nm. V 905 μl vody byl inkubován 1 μl mitochondriální frakce po dobu 3 min. Reakční směs dále obsahovala 50mM TRIS (pH 8,1), 2,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, 0,3mM KCN a 50 μM CoQ₁₀. Přídavkem 10 μl 10mM NADH byla reakce nastartována. Měření probíhalo 3 min. Poté byl přidán rotenon o finální koncentraci 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a další 3 min byla měřena aktivita komplexu I po inhibici specifickým inhibitorem - rotenonem. Výsledná specifická aktivita komplexu I je rozdílem aktivity naměřené bez a po inhibici rotenonem.

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 6,22$)

4.2.3.8.4 Spektrofotometrické měření aktivity komplexu II

Specifická aktivita komplexu II byla stanovena na základě měření poklesu absorbance oxidovaného akceptoru elektronů 2,6-dichlorofenol-indofenolu (DCPIP) při 600 nm. Reakční směs obsahovala 1 μl mitochondriální frakce, 10mM KPi (pH 7,0), 2mM EDTA, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, 3 μM rotenon, 10mM sukcinát, 0,2mM ATP a 0,3mM KCN. Směs byla inkubována 3 min při pokojové teplotě. Poté byl do reakce přidán DCPIP a antimycin o finální koncentraci 80 μM , resp. 1 μM . Měření bylo prováděno po dobu 3 min od nastartování reakce přídavkem 50 μM CoQ₁₀.

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 20,1$)

4.2.3.8.5 Spektrofotometrické měření aktivity komplexu II-III a komplexu III

Pro stanovení aktivity komplexů II-III a III byla použita reakční směs, která obsahovala 10mM KPi, 2mM EDTA, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, 1 μl vzorku mitochondriální frakce, 3 μM rotenon, 10mM sukcinát, 0,2mM ATP a 0,3 mM KCN. Reakce byla odstartována 40 μl cytochromu c (oxidovaného) o finální koncentraci 40 μM . Změna absorbance při vlnové délce 550 nm byla zaznamenávána po dobu 1 min (měření aktivity komplexu II). Poté byla reakce zastavena 10 μl 1M malonátu a inkubována 1 min. Měření aktivity a inhibice komplexu III bylo provedeno přídavkem 5 μl DBH₂ (měření po dobu 1 min) a 1 μM antimycinu (opět 1 min).

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 19,6$)

4.2.3.8.6 Spektrofotometrické měření aktivity komplexu I-III

Pro stanovení aktivity komplexů I-III byl měřen nárůst absorbance při 550 nm. V 855 μl vody byl inkubován 1 μl mitochondriální frakce po dobu 3 min. Poté bylo do kyvety připipetováno 50mM TRIS (pH 8,1), 2,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, 40 μM oxidovaný cytochrom *c* a 2mM KCN. Jako start reakce sloužilo 0,1mM NADH. Měření probíhalo 1 min. Reakce byla inhibována 50 μM rotenonem a pokles byl sledován při 340 nm. Výsledná specifická aktivita komplexu I-III je rozdílem aktivity naměřené v čistém vzorku a nespecifické aktivity po inhibici rotenonem.

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 19,6$)

4.2.3.8.7 Spektrofotometrické měření aktivity komplexu IV

Specifická aktivita komplexu IV byla naměřena jako úbytek absorbance redukováného cytochromu *c* při 550 nm. Reakční směs obsahovala: 40mM KPi (pH 7,0), 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, 10 μM redukováného cytochromu *c* a 2,5 μM laurylmaltosidu. Měření trvající 1 min bylo odstartováno přidavkem 1 μl mitochondriální frakce.

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 19,6$)

4.2.3.8.8 Spektrofotometrické měření aktivity citrátsyntázy

Specifická aktivita referenčního mitochondriálního enzymu citrátsyntázy (CS) byla naměřena jako změna absorbance vznikajícího koenzymu A při 412 nm. Reakční směs se skládala z 0,1mM DTNB, 0,5mM acetyl-koenzymu A, 2,5mM laurylmaltosidu a 1 μl mitochondriální frakce. Nejprve bylo měřena nespecifická aktivita bez přidavku oxalacetátu, který reakci odstartuje, po dobu 1 min. Po přidavku 50 μl oxalacetátu byla sledována aktivita enzymu po dobu 1 min. Specifická aktivita je rozdílem naměřeného vzrůstu absorbance a zjištěného pozadí (nespecifické aktivity).

(molární absorpční koeficient $\varepsilon = 13,6$)

5 Výsledky

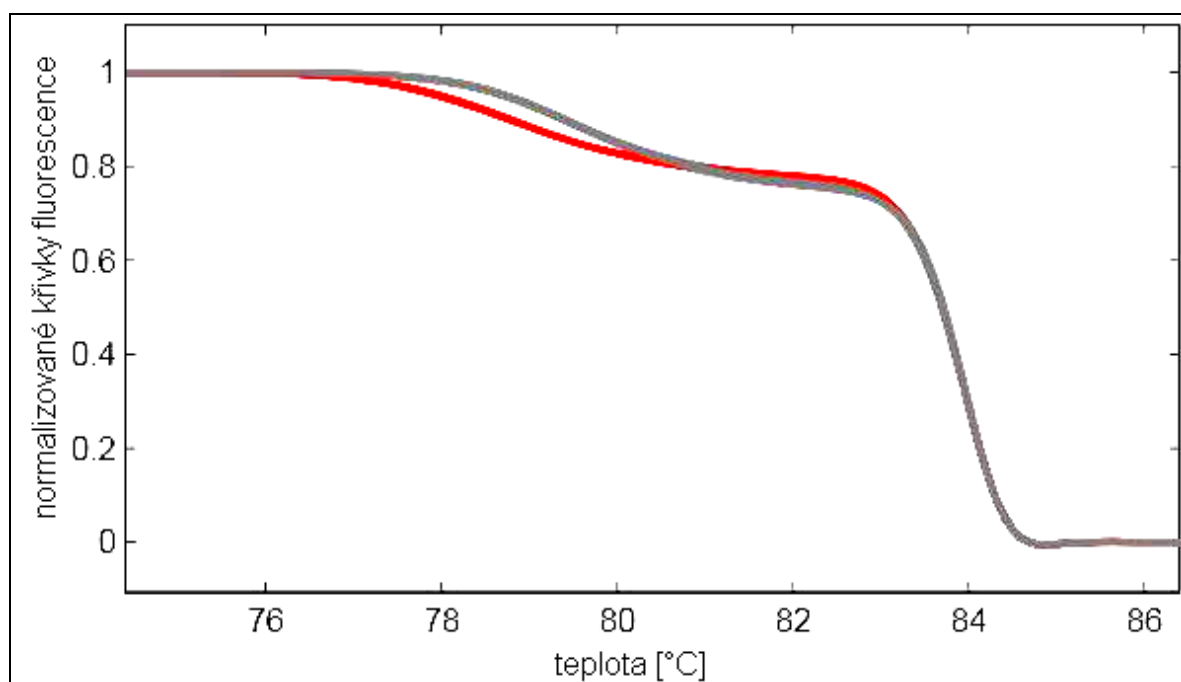
5.1 Analýza genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*

5.1.1 Optimalizace PCR reakcí

Pro účely molekulární diagnostiky byly zoptimalizovány PCR reakce všech navržených fragmentů, optimalizace jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 6).

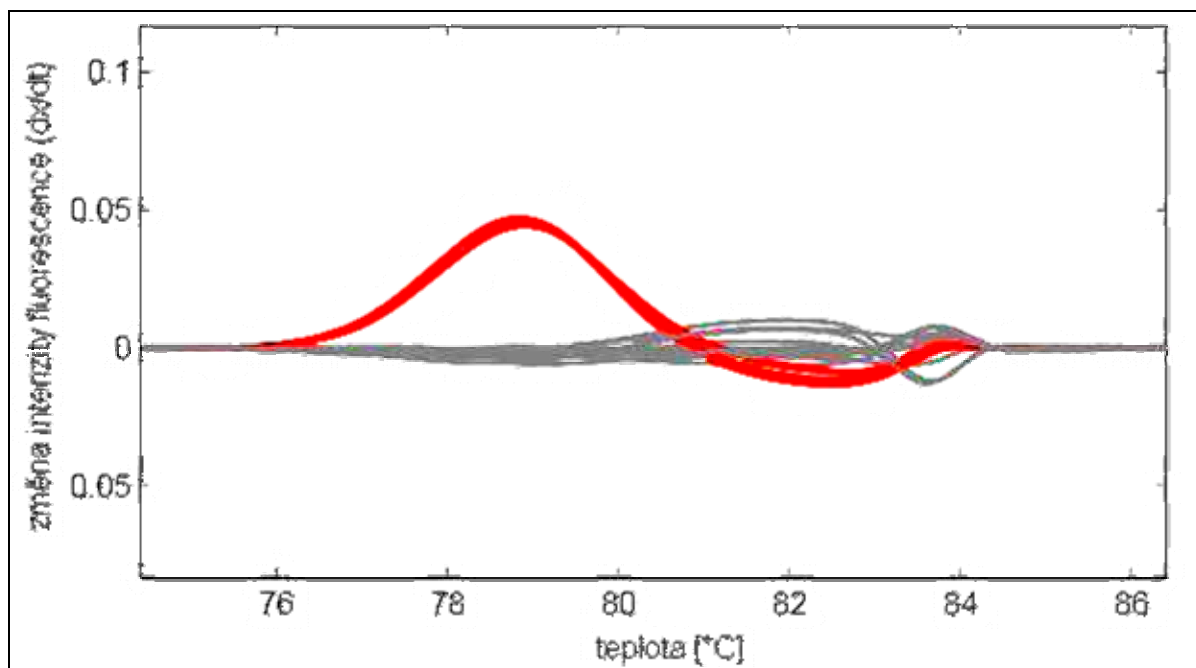
5.1.2 High Resolution Melting Analysis

Metoda High Resolution Melting Analysis (HRM) byla zoptimalizována pro vybrané fragmenty (viz Tabulka 6). Ve většině fragmentů podle HRM nebyly nalezeny žádné polymorfismy, což odpovídalo i výsledkům přímého sekvenování, v pěti případech byly detekovány falešně pozitivní výsledky (viz Graf 4). Tři ze čtyř nalezených polymorfních fragmentů nebyly optimalizovány pro účely HRM (viz Tabulka 6 a Tabulka 9). Ve fragmentu 5 genu *COQ2* byl metodou HRM detekován polymorfismus u pacientů P1 a P4. Vše bylo ověřeno přímým sekvenováním.



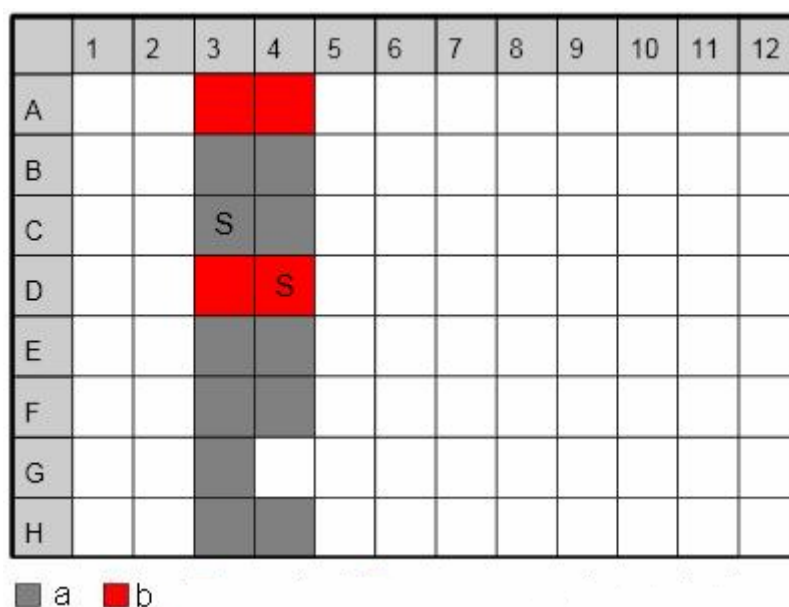
Graf 2: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu *COQ2* – normalizované křivky intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.

Světlá/tmavá šedá – křivky odpovídají danému vzorku podle obrázku (Obrázek 7). Software barevně rozlišil sobě podobné podskupiny vzorků. Analyzováno na přístroji LightScanner a pomocí Software for LightScanner (v.1.5.0.903), Idaho Technology Inc., USA.



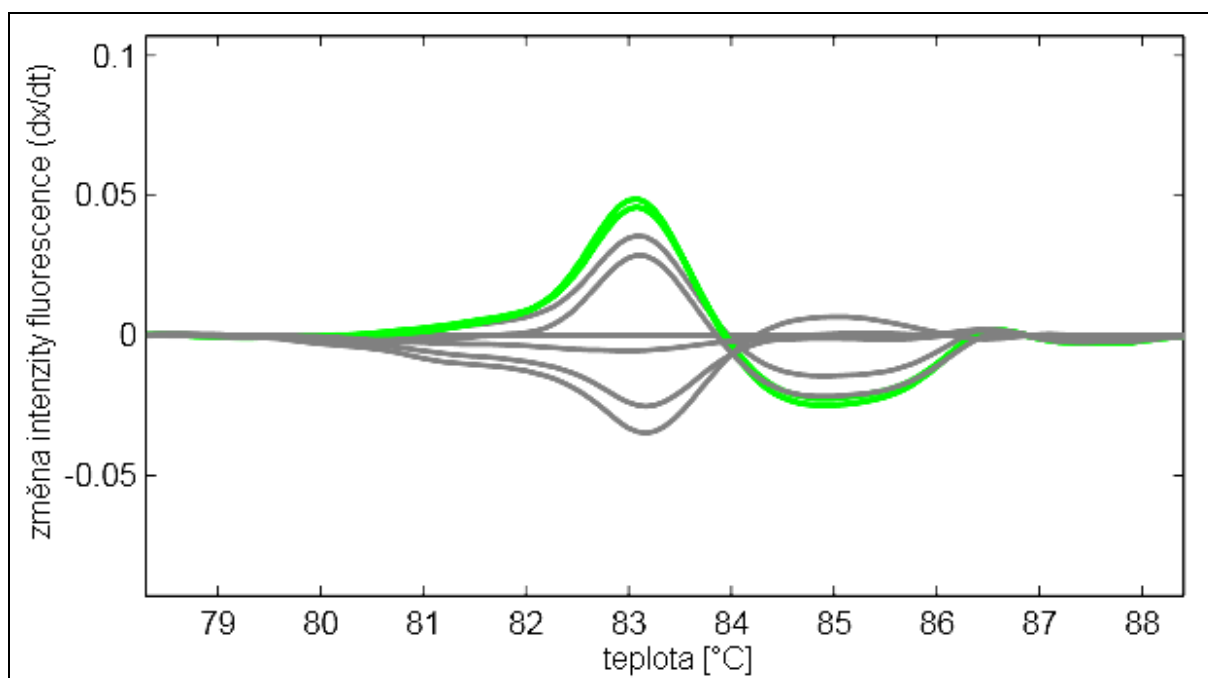
Graf 3: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu *COQ2* – derivace křivek intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.

Světlá/tmavá šedá – křivky odpovídají danému vzorku podle obrázku (Obrázek 7). Software barevně rozlišil sobě podobné podskupiny vzorků. Analyzováno na přístroji LightScanner a pomocí Software for LightScanner (v.1.5.0.903), Idaho Technology Inc., USA.



Obrázek 7: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 5 genu *COQ2* – schéma 96jamkové destičky.

A – H – vzorky pacientů P1 – P8; 3, 4 – pozice dubletu vzorků fragmentu 5; Světlá(a)/tmavá(b) šedá – softwarem predikované podskupiny sobě podobných vzorků; S – softwarem určený standardní vzorek predikované podskupiny. Analyzováno pomocí Software for LightScanner (v.1.5.0.903), Idaho Technology Inc., USA.



Graf 4: Výstup metody High Resolution Melting Analysis fragmentu 3 genu *COQ2* – derivace křivek intenzity fluorescence v průběhu denaturace fragmentu.

Šedě/zeleně – křivky odpovídají danému vzorku. Software barevně rozlišil sobě podobné podskupiny vzorků.

5.1.3 Sekvenování genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APT*

Byly analyzovány sekvenční exonů genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APT* pacientů s podezřením na primární deficienci CoQ₁₀ (P1 – P9, P11 a P12) včetně přilehlých intronních sekvencí. Dále byly analyzovány sekvenční exonů genů *PDSS1* a *APT* pacienta P10 a jim přilehlé intronní sekvenční.

V analyzovaných sekvencích nebyly nalezeny žádné patogenní mutace. Byly nalezeny jen popsané nepatogenní jednobázové polymorfismy (SNP) – dle databáze SNP (podle <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> - viz Tabulka 9).

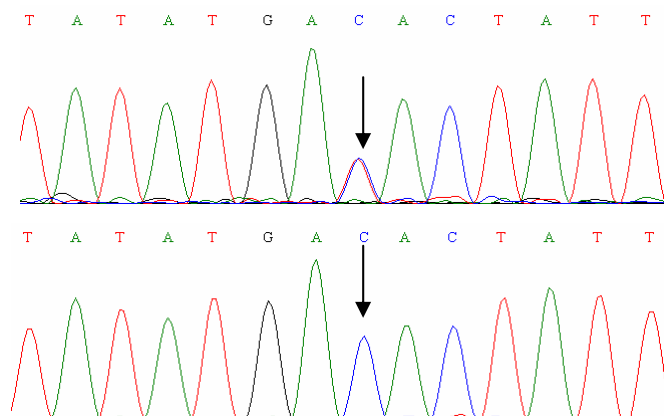
V genu *COQ2* (NM_015697.6) byly nalezeny tři různé SNP. Dva jsou synonymní – c.783T>C (rs6535454, Obrázek 8) a c.879C>T (rs1129617). c.85G>T (rs6818847) je nesynonymní a mění v sekvenci proteinu na 66. pozici valin na leucin - p.V66L (NP_056512.5). Všechny tyto polymorfismy jsou poměrně četné (32, 26, resp. 49 % heterozygotů v populaci) a nejedná se tedy o patogenní mutace.

V genu *CABC1* (NM_020247.4) byl nalezen SNP c.117G>A (rs11549708). Jedná se o synonymní záměnu, tuto záměnu nese 20 % populace v heterozygotní formě.

Tabulka 9: Jednobázové polymorfismy nalezené v sekvencích exonů a přilehlých intronních oblastí genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX* pacientů P1 – P12.

	<i>PDSS1</i>	<i>PDSS2</i>	<i>COQ2</i>	<i>COQ9</i>	<i>CABC1</i>	<i>APTX</i>
P1	-	-	c.85G>T/wt c.783T>C /wt c.879C>T /wt	-	-	-
P2	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P3	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P4	-	-	c.85G>T/wt c.783T>C /wt c.879C>T/wt	-	-	-
P5	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P6	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P7	-	-	c.783T>C 783T>C	-	-	-
P8	-	-	c.783T>C/783T>C	-	-	-
P9	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P10	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-
P11	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
P12	-	-	c.783T>C/783T>C	-	c.117G>A/wt	-
průměrný výskyt heterozygotů v populaci	-	-	c.85G>T – 32 % c.783T>C – 26 % c.879C>T – 49 %	-	c.117G>A – 20 %	-

- - nebyly nalezeny žádné mutace ani polymorfismy
n.a. - sekvence nebyly analyzovány
wt - „wild type“ – v populaci běžná alela



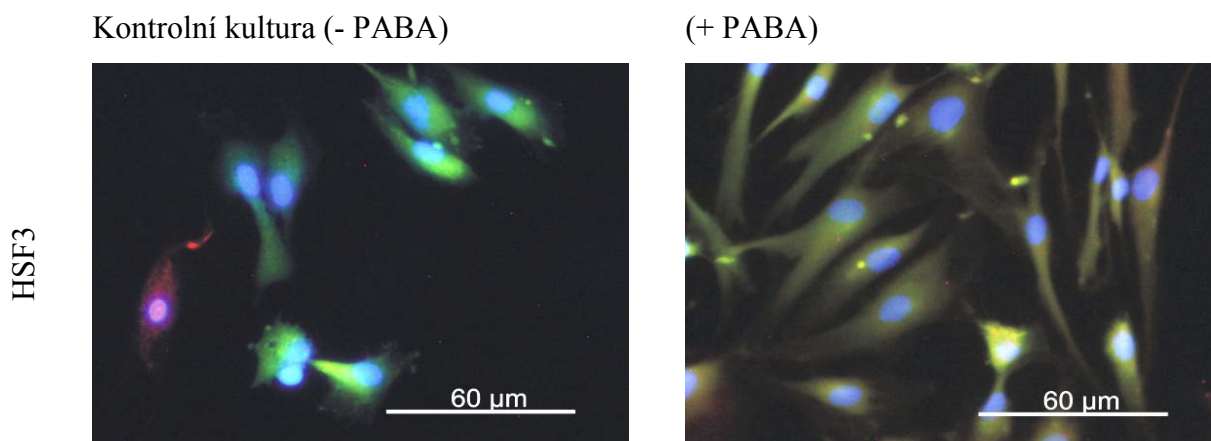
Obrázek 8: Jednobázový nepatogenní polymorfismus v kódující sekvenci fragmentu 5 genu *COQ2* (rs6535454).

Nahoře: heterozygot c.783T>C/wt (P1), dole: homozygot c.783T>C/c.783T>C (P2) podle NM_015697.6.

5.2 Analýzy modelu deficience koenzymu Q_{10} *in vitro*

5.2.1 Viabilita

Viabilita buněk po kultivaci s PABA byla ověřena komerčním produktem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells (Invitrogen, USA). Živé buňky byly obarveny 1 μ M Calceinem AM zeleně, DNA (jaderná i mitochondriální) mrtvých buněk byla obarvena červeně 5 μ M EthD-1 (ethidium bromid). Žádné změny viability buněk nebyly po kultivaci s PABA zaznamenány. Buňky byly viabilní a dobře snášely pasážování (Obrázek 9).

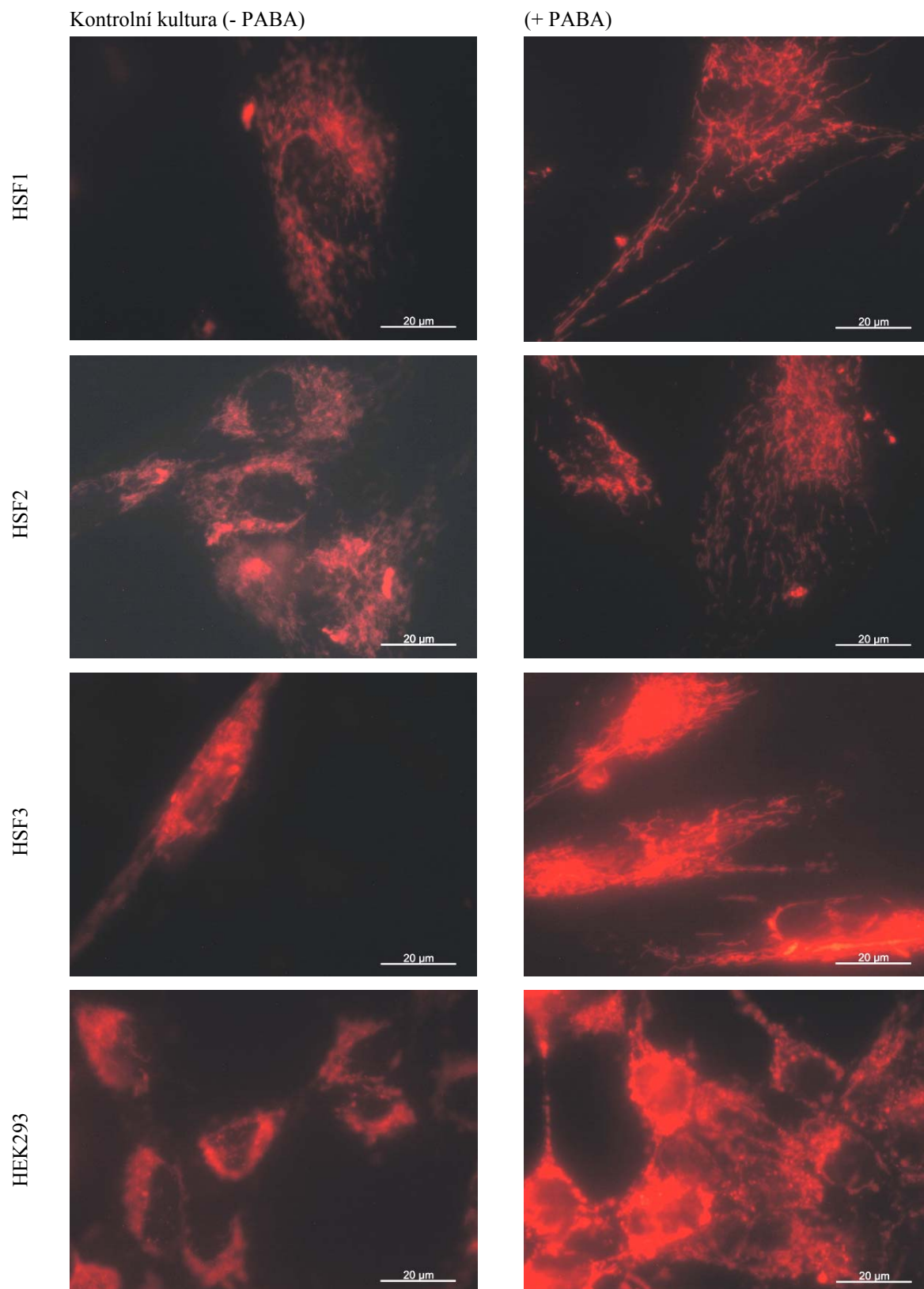


Obrázek 9: Test viability kultury lidských kožních fibroblastů (HSF3) po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

Značení pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells, zvětšení 200x, automatická expozice. Cytoplasma živých buněk – zeleně. Jádra mrtvých buněk – červeně. Jádra všech buněk značena Höchst 33342, mitochondriální síť všech buněk značena MitoTracker CMX RossTM, automatická expozice. Koncentrace PABA: 1mM v médiu.

5.2.2 Mitochondriální síť

Mitochondriální síť byly vizualizovány fluorescenční sondou MitoTracker CMX RossTM. Morfologie mitochondriálních sítí byla značně heterogenní. Byly pozorovány buňky s fragmentovanou mitochondriální sítí, ale i buňky s dlouhými mitochondriemi. A to jak v kulturách kontrolních, tak i v kulturách kultivovaných s PABA (Obrázek 10).

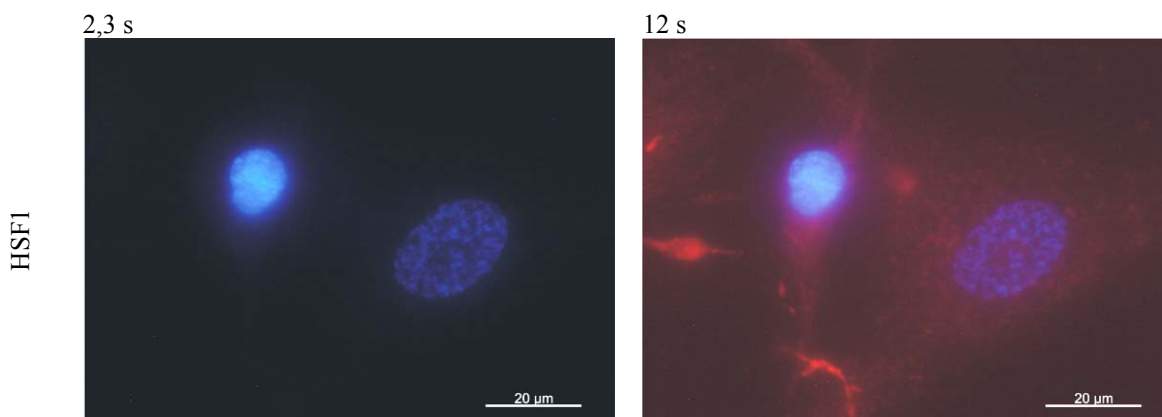


Obrázek 10: Morfologie mitochondriálních sítí kultur lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

Kontrolní kultura (vlevo), buňky kultivované s 4-aminobenzoovou kyselinou (vpravo). Shora v řadách HSF1, HSF2, HSF3 a HEK293. Barvení MitoTracker CMX RossTM, automatická expozice. Koncentrace PABA: 1mM v médiu.

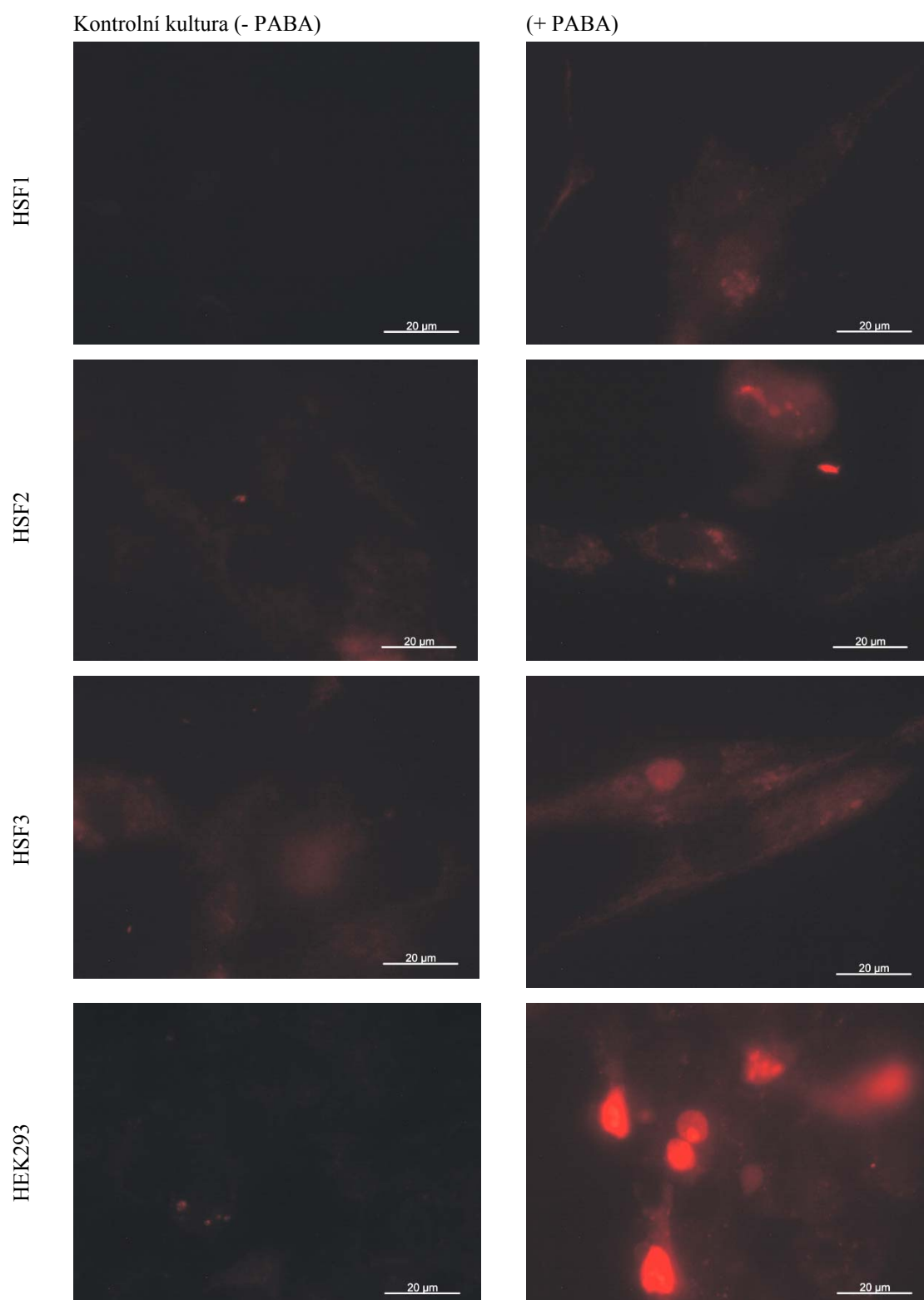
5.2.3 Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích

K detekci superoxidových radikálů byla použita fluorescenční sonda MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen, USA) (MitoSOX). Barvení a snímání signálu muselo být nejprve optimalizováno. Pro porovnání signálu byla využita možnost nastavení konstantního expozičního času. Kultury HSF po kultivaci s PABA jeví mírné zvýšení množství superoxidových radikálů (Obrázek 12). Linie HEK293 vykazovala větší nárůst koncentrace superoxidových radikálů než kultury fibroblastů. Barvení umožňuje do jisté míry lokalizovat ohniska vzniku superoxidových radikálů – mitochondriální síť. Stanovení pomocí fluorescenční mikroskopie je pouze semikvantitativní a pro přesnou kvantifikaci je zapotřebí použití jiných metod.



Obrázek 11: Optimalizace expozičního času pro detekci přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou v kultuře lidských kožních fibroblastů.

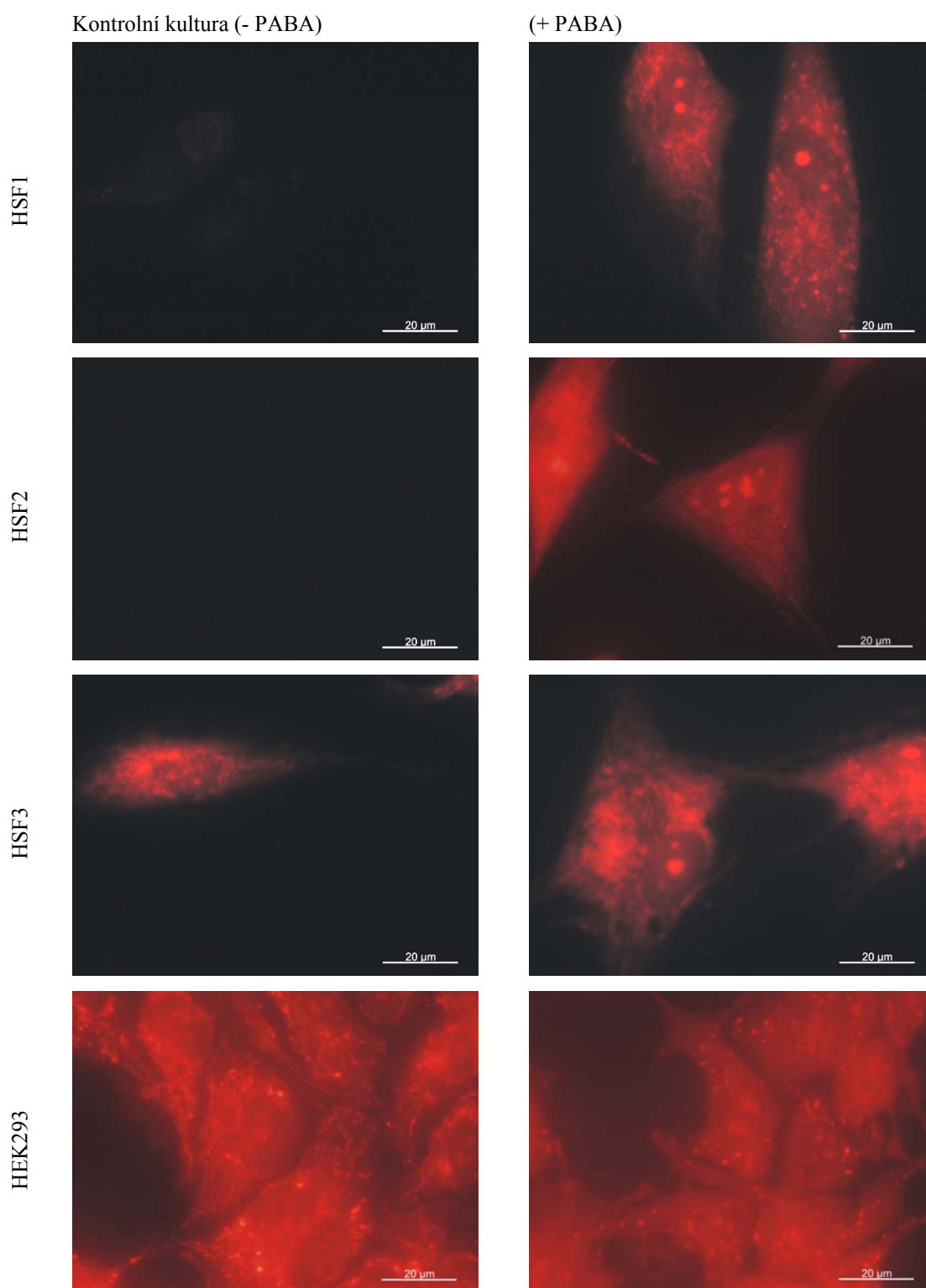
Buňky po inkubaci s 4-aminobenzoovou kyselinou. Zvětšení 600x. Vlevo barvení pomocí MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator s expozicí 2,3 s; vpravo s expozicí 12 s. Barvení jádra - Höchst 33342, automatická expozice. Koncentrace PABA: 1mM v médiu.



Obrázek 12: Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v mitochondriích u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou. Kontrolní kultura (vlevo), buňky kultivované s 4-aminobenzoovou kyselinou (vpravo). Shora v řadách HSF1, HSF2, HSF3 a HEK293. Barvení MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator, expozice HSF i HEK293 - 2,3 s. Koncentrace PABA: 1mM v médiu.

5.2.4 Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v rámci celé buňky

Superoxidové radikály v cytoplasmě byly detekovány pomocí fluorescenční sondy – dihydroethidia (DHE). V případě HSF1 a HSF2 byl signál u kontrolních buněk velmi slabý, naopak signál buněk po kultivaci PABA se zvýšil. Při konstantním expozičním čase se tedy jeví, že v kontrolních buňkách nebyly žádné ROS detekovány. V případě HSF3 mezi kontrolními buňkami a buňkami po kultivaci s PABA nebyl pozorovatelný rozdíl. Podobně reagovala i linie HEK293.



Obrázek 13: Detekce přítomnosti superoxidových radikálů v rámci celé buňky u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

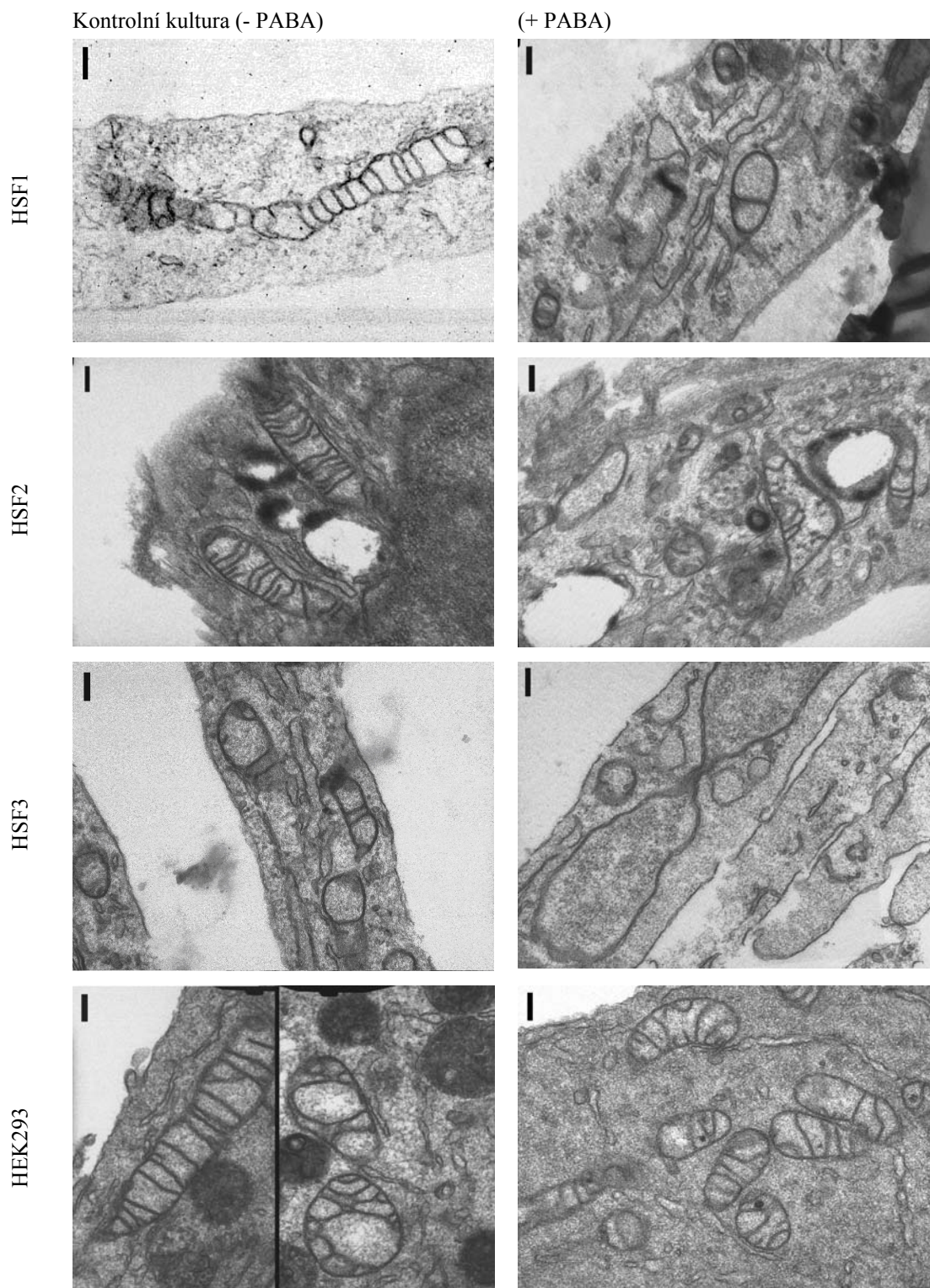
Kontrolní kultura (vlevo), buňky kultivované s 4-aminobenzoovou kyselinou (vpravo). Shora v řadách HSF1, HSF2, HSF3 a HEK293. Zvětšení 600x. Měřítko – 20 µm. Barvení dihydroethidiem, expozice 2,3 s. Koncentrace PABA: 1mM v médiu.

5.2.5 Ultrastruktura mitochondrií

Na snímcích buněk HSF a HEK293 pořízených pomocí transmisní elektronové mikroskopie nebyly pozorovány významnější rozdíly v morfologii mitochondrií.

U HSF kultivovaných s PABA lze pozorovat výskyt mitochondrií s normální morfologií i mitochondrií s pozměněnou mitochondriální ultrastrukturou. Takové případy můžeme charakterizovat sníženým množstvím krist a „bobtnáním“ (zdá se, že se mitochondrie „nafukují“), byly pozorovány i mitochondrie s abnormálně tvarovanými kristami. Podobně pozměněné mitochondrie byly pozorovatelné i na snímcích kontrolních buněk. Na řadě snímků buněk HSF1 a HSF3 kultivovaných s PABA byl pozorovatelný dilatovaný systém cisteren – pravděpodobně endoplazmatického retikula.

V případě HEK293 je tvarová heterogenita mitochondrií ještě výraznější. A to jak v kontrolních buňkách, tak i na snímcích buněk kultivovaných s PABA. Vzhledem k rozmanitosti mitochondrií po kultivaci s PABA i kontrolních vzorků není možné pozorované změny považovat za charakteristické pro působení PABA.



Obrázek 14: Ultrastruktura mitochondrií u lidských kožních fibroblastů a HEK293 buněk po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

Kontrolní kultura (vlevo), buňky kultivované s 4-aminobenzoovou kyselinou (vpravo). Shora v řadách HSF1, HSF2, HSF3 a HEK293. Zvětšení 25 000x. Měřítko – 200 nm. Koncentrace PABA: 1mM v médiu. Transmisní elektronový mikroskop JEM-1200Ex (JEOL, Japonsko). Měřítko 200 nm.

5.3 Biochemické analýzy

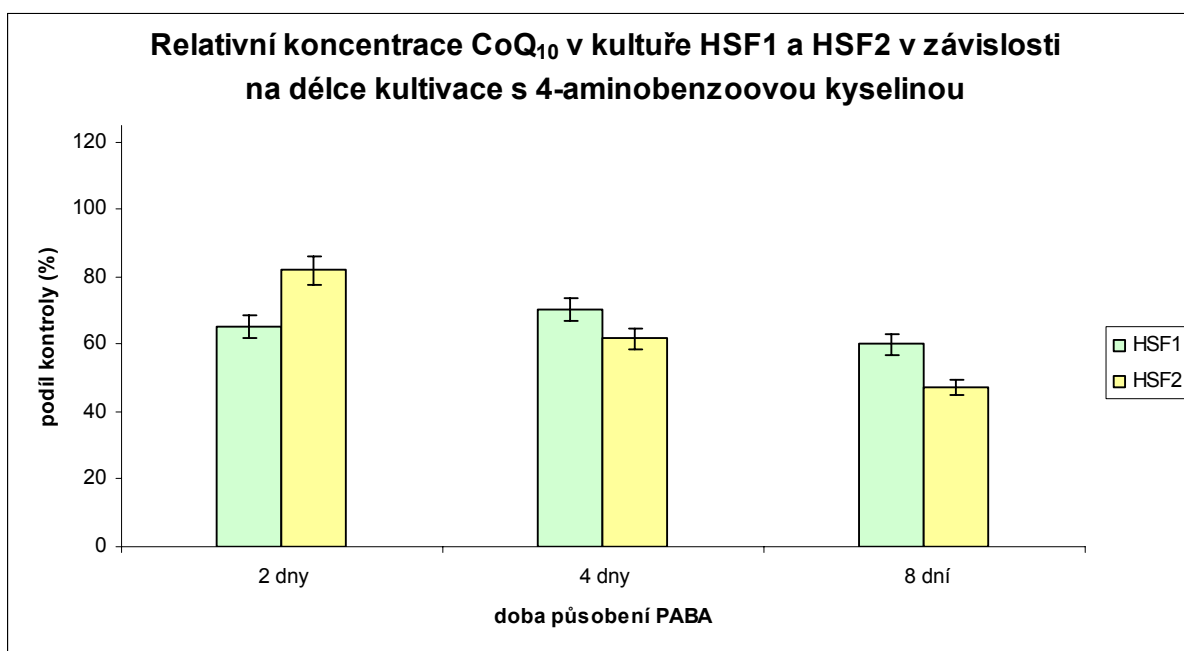
5.3.1 Měření změn koncentrace koenzymu Q₁₀

Koncentrace CoQ₁₀ byla měřena ve vzorcích homogenátů buněk HSF1-HSF3 a HEK293 (viz 4.2.2.1). V kulturách HSF1 a HSF2 byla stanovena časová závislost koncentrace CoQ₁₀ na délce kultivace. V kultuře HSF1 došlo již po dvou dnech kultivace k poklesu koncentrace CoQ₁₀ z 59 na 38 pmol.mg⁻¹. Po čtyřech, resp. osmi dnech kultivace došlo ke snížení na 41 resp. 35 pmol.mg⁻¹. Koncentrace CoQ₁₀ se srovnatelně snižovala i v případě kultury HSF2. U kultury HSF1 došlo již po dvou dnech k signifikantnímu snížení CoQ₁₀ na 65 % kontrolního vzorku, čímž se dostáváme do rozmezí pozorovaných relativních koncentrací CoQ₁₀ u pacientů s podezřením na deficienci CoQ₁₀ (30 – 70 % spodní hranice referenčního rozmezí pro danou věkovou skupinu).

Kultura HSF2 reagovala na působení PABA zpočátku pomaleji než HSF1, ale později koncentrace CoQ₁₀ klesala rychleji než u HSF1. Osmý den kultivace dosahovala koncentrace CoQ₁₀ u HSF2 47 % kontroly. Pozorování změn koncentrace CoQ₁₀ v závislosti na době kultivace posloužilo ke stanovení optimální doby kultivace s PABA. Pro všechny další experimenty byla vybrána čtyřdenní kultivace s 1mM PABA.

Z dalších experimentů na kulturách HSF3 a HEK293 po čtyřdenní kultivaci s PABA je patrné, že u jednotlivých kultur a linií je koncentrace CoQ₁₀ individuální (pohybovala se od 59 do 110 pmol.mg⁻¹ u HSF; a 186 pmol.mg⁻¹ u HEK293). Také relativní koncentrace CoQ₁₀ je snížena u jednotlivých buněk do různé míry. HSF reagovaly snížením na 62 – 70 % kontroly, HEK293 dokonce až na 41 % kontroly.

Výsledky měření koncentrace CoQ₁₀ v primárních kulturách HSF a HEK293 buňkách po inkubaci s PABA jsou shrnuty v grafech (Graf 5, Graf 6) a tabulkách (Tabulka 10, Tabulka 11). Koncentrace jsou vztaženy na množství proteinu ve vzorku.



Graf 5: Relativní koncentrace koenzymu Q₁₀ po kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou u HSF1 a HSF2.

Koncentrace CoQ₁₀ je vyjádřena jako podíl koncentrace CoQ₁₀ v homogenátu buněk kultivovaných s 4-aminobenzoovou kyselinou (PABA) po dobu 4 dní a koncentrace CoQ₁₀ v homogenátu paralelně kultivovaných buněk v médiu bez přítomnosti PABA (kontrola = 100%, viz 4.2.2.1).

Tabulka 10: Koncentrace koenzymu Q₁₀ v lidských kožních fibroblastech (HSF1) po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

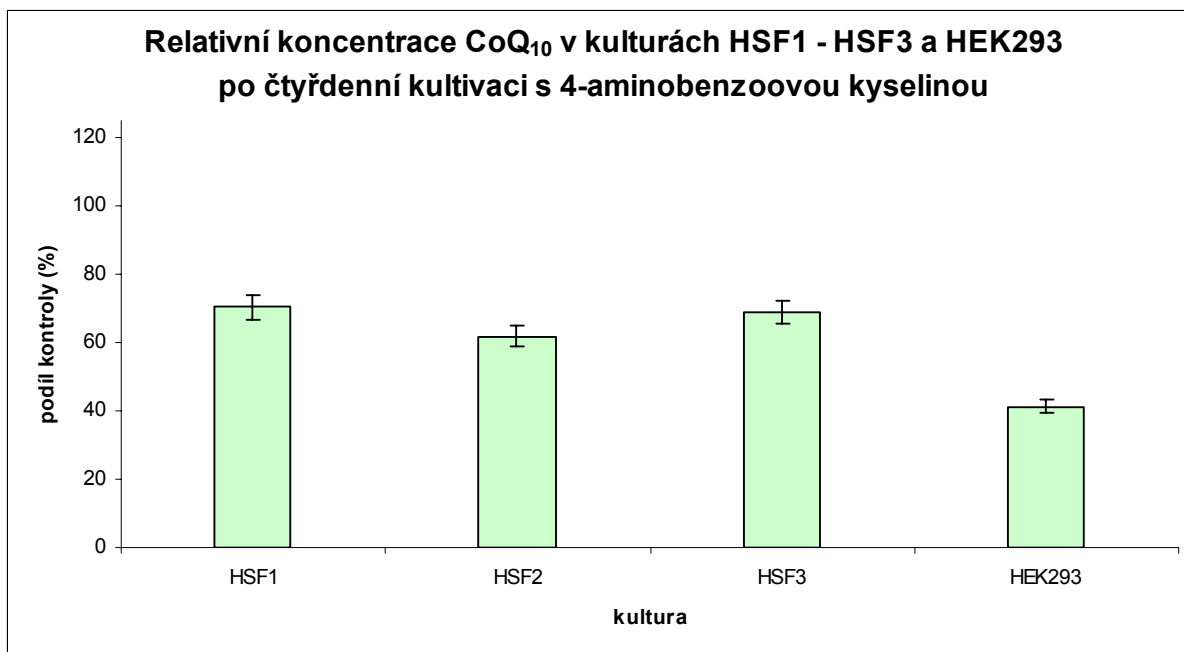
(v pmol.mg⁻¹)

doba kultivace	2 dny	4 dny	8 dní
kontrola (- PABA)	58,90	59,86	57,20
(+ 1 mM PABA)	38,31	41,30	35,22
podíl kontroly	65 %	69 %	62 %

Tabulka 11: Koncentrace koenzymu Q₁₀ po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou u kultur HSF1 – HSF3 a HEK293.

(v pmol.mg⁻¹)

	HSF1	HSF2	HSF3	HEK293
kontrola	58,86	101,42	109,80	185,62
s PABA	41,30	62,58	75,49	76,58
podíl kontroly	69 %	62 %	69 %	41 %



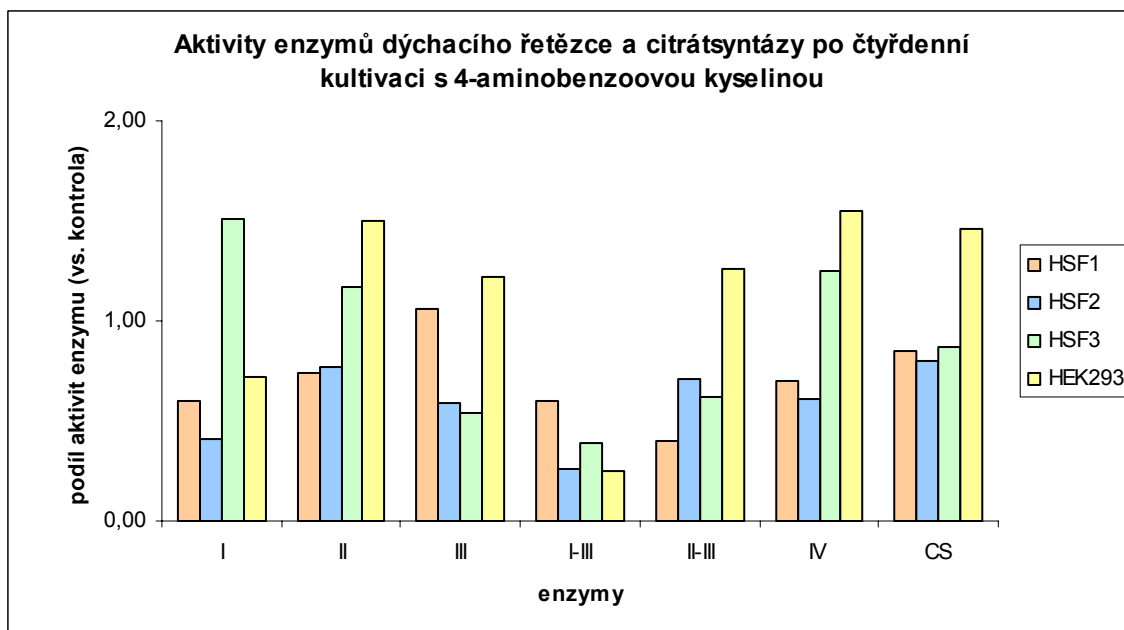
Graf 6: Relativní koncentrace koenzymu Q₁₀ po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou v kulturách lidských kožních fibroblastů HSF1 – HSF3 a HEK293.

Koncentrace CoQ₁₀ je vyjádřena jako podíl koncentrace CoQ₁₀ v homogenátu buněk kultivovaných s 4-aminobenzoovou kyselinou (PABA) po dobu 4 dní a koncentrace CoQ₁₀ v homogenátu paralelně kultivovaných buněk v médiu bez přítomnosti PABA (kontrola = 100%, viz 4.2.2.1). Relativní koncentrace CoQ₁₀ se v případě HSF kultur pohybovala mezi 0,6 - 0,7 kontroly. U linie HEK293 se koncentrace CoQ₁₀ po kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou se blížila 40 % kontroly.

5.3.2 Spektrofotometrická měření aktivit enzymů dýchacího řetězce

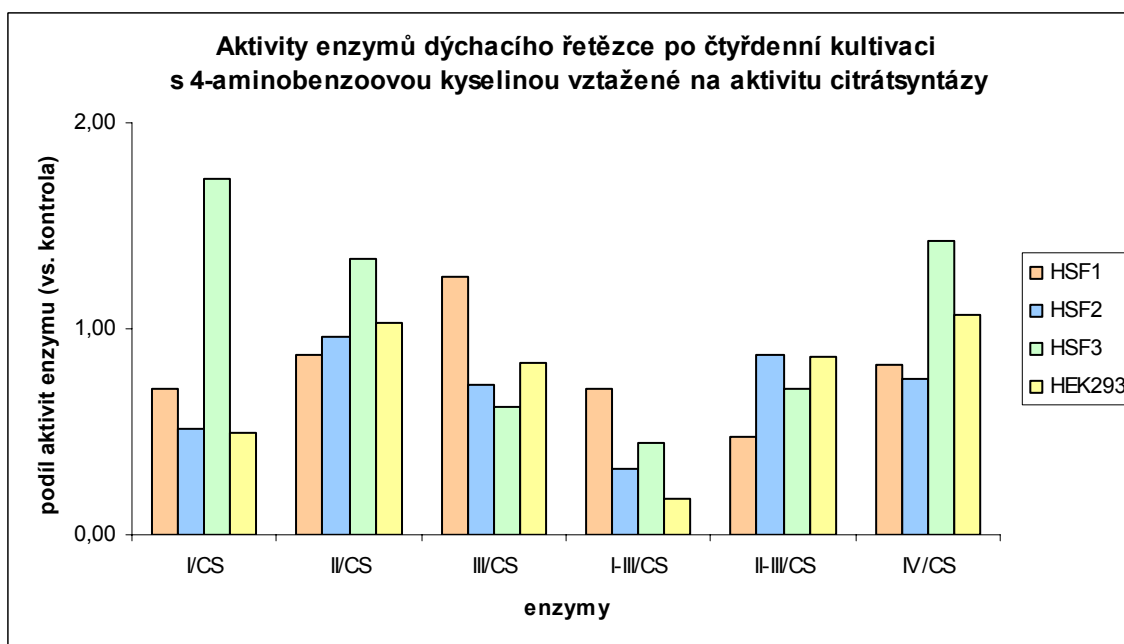
V izolovaných mitochondriálních frakcích kultur HSF1 – HSF3 a HEK293 po čtyřdenní kultivaci s PABA (viz 4.2.2.1) byly změřeny aktivity enzymů dýchacího řetězce a citrátsyntázy (viz Graf 7, Graf 8 a Graf 9). Aktivity byly měřeny v dubletu, v grafech jsou použity hodnoty získané jako průměr z obou měření.

Aktivita citrátsyntázy se po kultivaci s PABA u HSF snižuje. V případě HEK293 se naopak signifikantně zvyšuje. Nejvýznamnější pokles aktivit enzymů OXPHOS po inkubaci buněk s PABA byl zaznamenán v případě aktivity I-III a II-III (i méně než 50 % kontroly). Mírné snížení lze pozorovat i v případě komplexu I a III. V případě aktivity komplexu II dochází u kultur HSF1 a HSF2 k mírnému snížení, kultura HSF3 a HEK293 naopak reagovaly mírným zvýšením aktivity. Přesto jsou spřažené aktivity II-III u všech HSF sníženy. Aktivita komplexu IV zůstává takřka nezměněna.



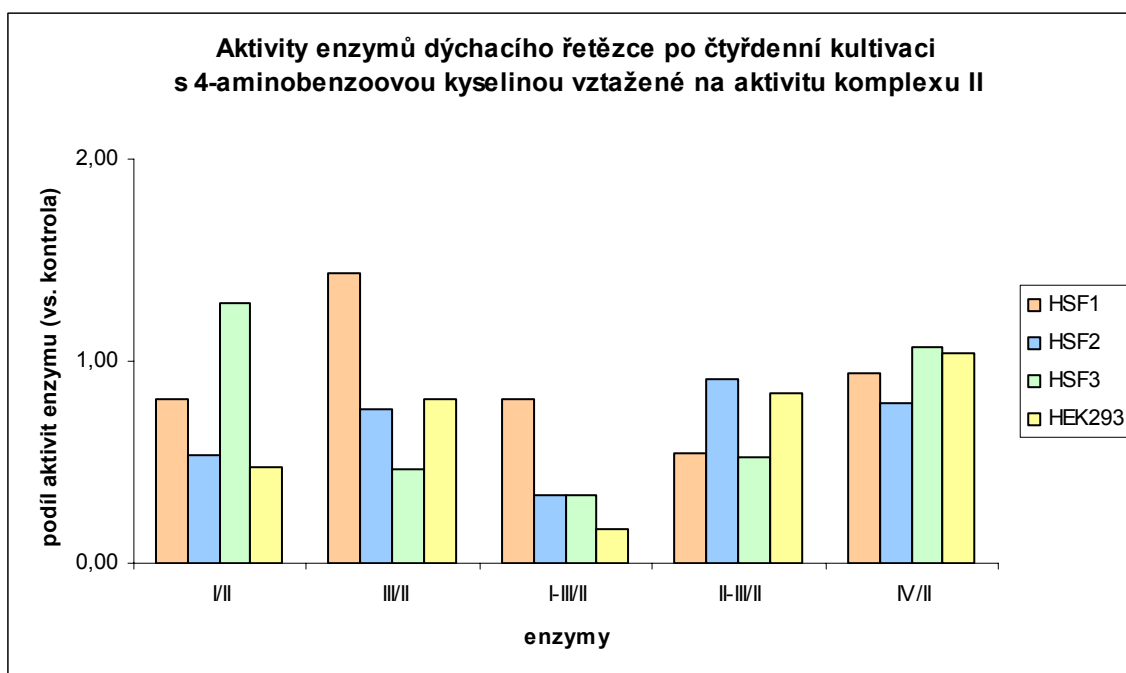
Graf 7: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách a po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

Aktivity naměřené u vzorků po čtyřdenní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou – PABA - (4.2.2.1) jsou vyjádřeny jako podíl aktivity kontrolní enzymů kultury kultivované v médiu bez přítomnosti PABA. CS – citrátsyntáza. Kontrola = 1,00.



Graf 8: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou normalizované na aktivitu citrátsyntázy.

Absolutní aktivity enzymů vzorků po čtyřdenní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou - PABA - (4.2.2.1) byly vztahovány na aktivitu referenčního enzymu – citrátsyntázy (CS) – v daném vzorku. Tyto aktivity jsou vyjádřeny jako podíl aktivity enzymů kultury kultivované v médiu bez přítomnosti PABA. Kontrola = 1,00.



Graf 9: Relativní aktivity enzymů dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou normalizované na aktivitu komplexu II.

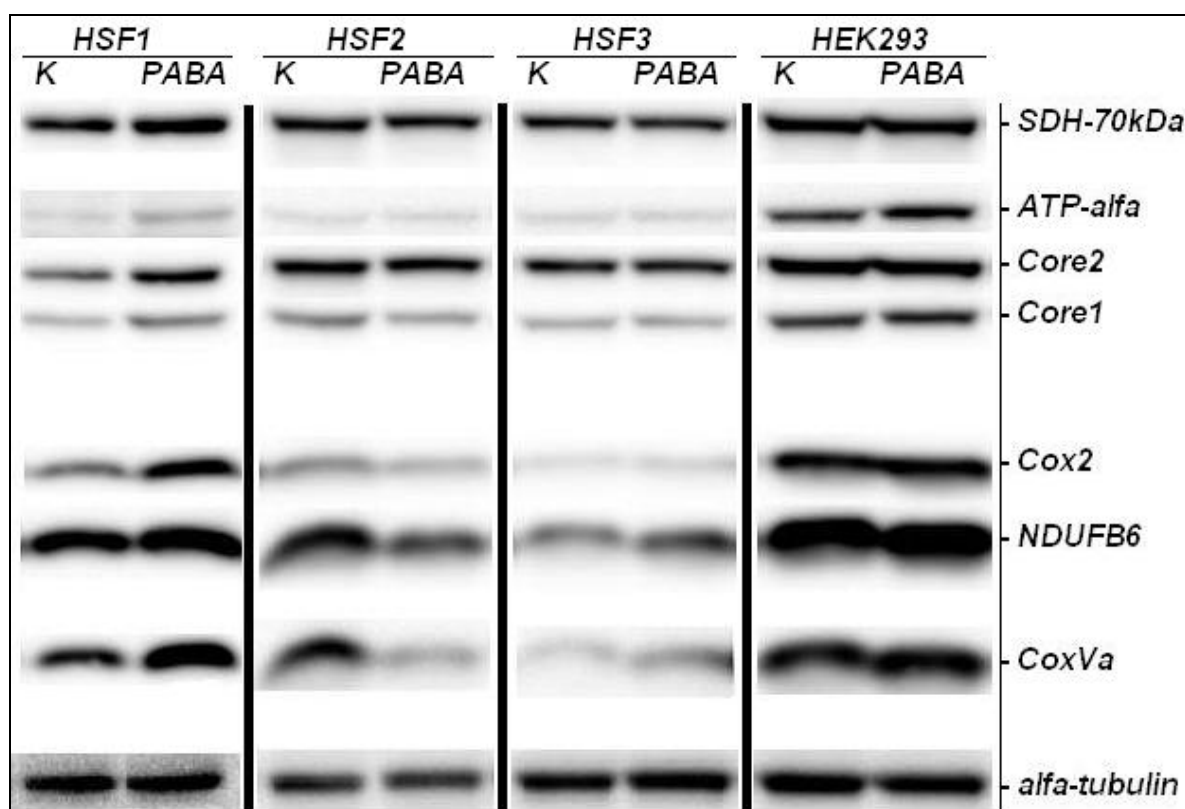
Absolutní aktivity enzymů vzorků po čtyřdenní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou - PABA - (4.2.2.1) byly vztaženy na aktivitu referenčního enzymu – komplexu II – v daném vzorku. Tyto aktivity enzymů jsou vyjádřeny jako podíl aktivity enzymů kultury kultivované v médiu bez přítomnosti PABA. Kontrola = 1,00.

5.3.3 Imunodetekce podjednotek komplexů dýchacího řetězce

Celobuněčné lyzáty vzorků HSF a HEK293 byly denaturovány v prostředí SDS a elektroforeticky rozděleny v 12% polyakrylamidovém gelu. Takto rozdělené proteiny byly na PVDF membráně označeny specifickými protilátkami a chemiluminiscenčně vizualizovány (Obrázek 15). Jako referenční „house-keeping“ protein byl použit α -tubulin. Signály byly vztaženy ke kontrolnímu vzorku. Signály byly kvantifikovány v softwaru Quantity One[®] verze 4.

Imunodetekce podjednotek enzymů OXPHOS ukazuje, že největší rozdíly v expresi podjednotek po čtyřdenní kultivaci se týkají komplexů I a IV. Kultury HSF1, HSF3 a HEK293 na kultivaci s PABA reagovaly relativním zvýšením exprese podjednotek NDUFB6, Cox2 a CoxV5. Kultura HSF2 naopak reagovala snížením exprese těchto podjednotek. Intenzita signálů podjednotek komplexů II a III (SDH-70kDa, Core1 a Core2) zůstává u všech kultur prakticky nezměněna (mimo HSF1).

Zjištěné změny přítomnosti podjednotek OXPHOS a α -tubulinu jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 12).



Obrázek 15: Analýza obsahu podjednotek komplexů dýchacího řetězce a ATPázy v lidských kožních fibroblastech (HSF) a HEK293 buňkách po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

Zleva: K – kontrolní vzorek kultury kultivovaný v médiu bez přítomnosti 4-aminobenzoové kyseliny, PABA - vzorek kultury kultivovaný v médiu s 1mM 4-aminobenzoovou kyselinou v médiu. Shora detekované podjednotky OXPHOS: SDH-70kDa (komplex II), ATP- α (komplex V), Core2 a Core1 (obojí komplex III), Cox2 (komplex IV), NDUFB6 (komplex I), CoxVa (komplex IV) a referenční α -tubulin. Nanáška 30 μ g proteinu na jamku. 12% polyakrylamidový gel.

Tabulka 12: Změny detekovaného signálu podjednotek OXPHOS po 4denní kultivaci s 4-aminobenzoovou kyselinou.

	SDH	ATP- α	Core2	Core1	Cox2	NDUFB6	CoxVa
HSF1	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
HSF2	*	*	*	↓	↓	↓	↓
HSF3	*	↓	*	*	↑	↑	↑↑
HEK293	*	↑	*	*	*	↑	↑

* - bez signifikantního rozdílu (méně než ± 10 % kontroly)

↑ - zvýšení signálu (↑↑ o více než 100 % kontroly)

↓ - snížení signálu (0 – 90 % kontroly)

6 Diskuse

6.1 Molekulárně-genetické analýzy genů

Prvním cílem mé diplomové práce bylo zavést molekulární diagnostiku genů *PDSSI1*, *PDSSI2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*, které souvisejí s primární deficiencí CoQ₁₀. Vyhledem k malému počtu dosud popsáných pacientů a heterogenitě popsáných mutací se jako nevhodnější jeví metoda sekvenování studovaných genů. Pro genetická vyšetření je v diagnostické praxi dostupná genomová DNA. Proto byla zvolena jako výchozí materiál pro tuto práci, přestože analýzou genomové DNA není možné rozpoznat všechny typy patogenních mutací, které mohou ovlivňovat např. sestřih mRNA, nebo další procesy, které mají vliv na expresi a funkčnost proteinového produktu vlastního genu. Metoda přímého sekvenování je již poměrně běžně dostupná, ale je stále finančně a časově náročná, proto dalším cílem bylo zavedení skriningové metody, která by pomohla vytřídit vzorky vhodné pro další zkoumání. Jednoduchou a levnou skriningovou metodu lze s výhodou použít právě u genů, u kterých se předpokládá velké množství analyzovaných vzorků. Jako skriningová metoda byla zvolena metoda High Resolution Melting Analysis (HRM) pomocí LightScanneru – přístroje firmy Idaho Technology Inc., USA, kterým laboratoř disponuje. Amplifikaci PCR reakcí v přítomnosti interkalačního fluorescenčního barviva, které se kvantitativně inkorporuje do vznikající dvouvláknové DNA, vzniká specifický produkt. Princip analýzy spočívá v postupném zahřívání vzorku, který je pozvolna denaturován. Během denaturace fragmentu DNA se barvivo uvolňuje a CCD kamerou je snímána měnící se intenzita fluorescence ve velmi krátkých intervalech (0,1 s). Získaná křivka intenzity fluorescence v průběhu denaturace v závislosti na teplotě je pro daný produkt specifická a záleží na sekvenci analyzované DNA. Obvykle i jednobázová záměna způsobí změnu tvaru křivky. V praxi je možné touto metodou rozdělit velkou skupinu vzorků na menší skupiny, sobě podobnější, ze kterých postačí sekvenovat jen vybrané zástupce a nalezené záměny u ostatních vzorků jen potvrdit některou z levnějších metod (např. restriční analýzou). Metoda HRM je nevhodná pro analýzu fragmentů, které obsahují více polymorfismů, nebo fragmentů, jejichž amplifikaci pomocí PCR není možné zoptimalizovat tak, aby vznikl jediný specifický produkt. Uvádí se, že metodou HRM lze dostatečně citlivě analyzovat fragmenty o délce do 500 bp. Naopak výhodou metody HRM je, že vzorek po analýze na LightScanneru lze použít pro další analýzy (např. sekvenování nebo restriční analýzy).

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že metoda HRM je vhodná pro analýzu 25 navzájemných fragmentů genů *PDSSI1*, *PDSSI2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*, u kterých

výsledky HRM odpovídaly výsledkům přímého sekvenování. V případě pěti fragmentů byly metodou HRM zjištěny falešně pozitivní výsledky. Jen v případě jednoho vzorku se objevil falešně negativní výsledek. U fragmentu 5 genu *COQ2* byla změna křivky tání potvrzena nálezem polymorfismů metodou přímého sekvenování.

Obě optimalizované metody (HRM i přímé sekvenování) jsou tedy připraveny pro zavedení do rutinní praxe.

Druhým cílem mé práce byla analýza gDNA vybraných pacientů s podezřením na primární deficienci CoQ₁₀. Analýzy připravených fragmentů neprokázaly přítomnost patogenních mutací v kódující sekvenci žádného z analyzovaných genů. Absence výskytu patogenní mutace v exonech genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX* nemůže vyloučit primární deficienci CoQ₁₀. Porucha exprese daného proteinu může probíhat až na transkripční úrovni – patogenní mutace přítomná v intronní sekvenci může ovlivnit rozpoznání sestřihového místa. Nelze také vyloučit, že pacienti nesou patogenní mutaci v některém z dalších genů kódujících enzymy biosyntetické dráhy CoQ₁₀.

6.2 Analýzy modelu deficience koenzymu Q₁₀ *in vitro*

Třetím cílem mé diplomové práce bylo studium deficience CoQ₁₀ *in vitro* na kultivovaných fibroblastech zdravých kontrol. Vzhledem k výsledkům prvních experimentů byl model aplikován i na imortalizovanou linii HEK293.

Kultury fibroblastů patří mezi nejběžněji dostupný materiál pacientů, který poskytuje široké pole možností pro další zkoumání. V literatuře popsané studie modelu deficience CoQ₁₀ *in vitro* jsou aplikovány výhradně na nádorové nebo imortalizované linie lidských buněk. Pro detailnější pochopení mechanismu deficience CoQ₁₀ u konkrétních pacientů se přitom jeví primární kultury jako mnohem vhodnější materiál. Cílem mé práce bylo tedy sledovat chování primárních kultur fibroblastů zdravých kontrol a porovnat je s dosud publikovanými poznatky.

Pro *in vitro* analýzy bylo nutné stanovit ideální časový interval kultivace buněk s inhibitorem PABA s ohledem na relevanci získaných dat a technické možnosti pro kultivaci kultur v laboratoři. Pilotní experimentem tedy byla kultivace dvou kultur (HSF1 a HSF2) s PABA a sledování změn koncentrace CoQ₁₀ v závislosti na době kultivace. Na základě výsledků pokusu byla pro všechny další experimenty stanovena doba kultivace s PABA na 4 dny.

6.2.1 Měření změn koncentrace koenzymu Q₁₀

V předkládané práci byly stanoveny koncentrace CoQ₁₀ v HSF a HEK293 buňkách bez, nebo s přítomností 1mM PABA v médiu.

Z naměřených hodnot lze vyvodit, že ke snižování koncentrace CoQ₁₀ působením PABA skutečně dochází, ale byla zaznamenána variabilita v míře snížení koncentrace CoQ₁₀ ve spektru studovaných linií. Způsob, jakým se buňka s navozenou deficiencí CoQ₁₀ vyrovnává, může souviset s metabolickým nastavením buňky a jak u modelových buněk, tak i u pacientů je velmi individuální. Jsou známy případy pacientů s radikálně sníženou koncentrací CoQ₁₀, přičemž klinické nálezy nejsou závažnějšího charakteru (Mollet et al., 2007). Na druhou stranu jsou známy i případy pacientů, kteří měli koncentraci CoQ₁₀ jen mírně sníženou, ale klinická manifestace deficience CoQ₁₀ byla velmi závažná (Duncan et al., 2009).

Z naměřených hodnot pro jednotlivé kultury HSF i linie HEK293 (včetně studií Gonzalez-Aragon et al. (2005) a Duberley et al. (2010)) lze říci, že míra snížení koncentrace CoQ₁₀ záleží na buněčném typu, na který byl model CoQ₁₀ deficience pomocí inhibice PABA aplikován.

Gonzalez-Aragon et al. (2005) kultivovali buňky HL-60 v médiu o koncentraci 1mM PABA s přídavkem, nebo bez přídavku fetálního bovinního séra. Sledovali změny koncentrace CoQ₁₀, mitochondriálního membránového potenciálu a produkce superoxidových radikálů. Ani po 4 dnech kultivace nebyla snížena viabilita buněk. Bylo pozorováno signifikantní snížení transmembránového elektronového potenciálu vyplývajícího zřejmě z omezení oxidativní fosforylace HL-60 buněk. Kvantitativní analýza produkce superoxidových radikálů značením dihydroethidiem prokázala její zvýšení po kultivaci s PABA. Autoři také deklarovali, že stanovené změny dosáhly kontrolních rozmezí po exogenním přídavku 2μM CoQ₁₀. Dále uvádějí, že se u leukemické linie HL-60 po kultivaci s 1mM PABA snižovala koncentrace CoQ₁₀ na 40 % kontroly.

Na modelu neurálních buněk SHSY-5Y Duberley et al. (2010) změřili snížení koncentrace CoQ₁₀ - na 53,79 % kontroly. Autoři se nezmiňují, jak dlouho kultivace s PABA trvala.

Sledované rozdíly mezi imortalizovanými nebo nádorovými liniemi a kulturami primárních buněk je možné do jisté míry vysvětlit odlišným nastavením metabolismu buněk. Moreno-Sánchez a kolektiv diskutuje, že většina nádorových rychle rostoucích buněk

vykazuje pozměněný energetický metabolismus, oproti normálním buňkám dané tkáně. Energetický metabolismus nádorových buněk je nasměřován více glykolyticky. Oxidativní fosforylace je utlumena, přestože koncentrace kyslíku je dostatečně vysoká (Moreno-Sanchez et al., 2007). Například u hepatocelulárního karcinomu byla zaznamenána 2 – 17x vyšší hladina glykolýzy než u normálního hepatocytů potkana (Marin-Hernandez et al., 2006). Jako vysvětlení této strategie může být snaha o přežití podmínek hypoxie (se sníženou koncentrací O_2 v prostředí), ke kterému může docházet nedostatečnou angiogenezí v rychle rostoucím tumoru (Gatenby and Gillies, 2004). Linie, které uprostředňují glykolytický metabolismus, budou na sníženou koncentraci CoQ_{10} méně citlivé než primární buňky uprostředňující oxidativní fosforylaci v mitochondriích.

6.2.2 Charakterizace kultivovaných fibroblastů a HEK293 buněk

Vzhledem k povaze použitého inhibitoru (vitamín Bx) se nedal předpokládat toxický charakter působení na kultivované buňky, komerční produkt LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells detekoval živé buňky barvením kalceinem a mrtvé buňky barvením jádra ethidiumbromidem. Tento test nemůže být ekvivalentem sestavení růstové křivky kultury. Nicméně v žádné z kultur HSF1-HSF3 a HEK293 nebyl zaznamenán zvýšený podíl mrtvých buněk, kultury dobře snášely i více než 18 dní kultivace s PABA včetně pasážování.

Fluorescenční barvení sondou MitoTracker CMX Ross™ umožnilo vizualizovat případné anomálie v morfologii mitochondriální sítě buněk po čtyřdenní kultivaci s PABA. Řada buněk kultur HSF měla rozmanitou morfologii mitochondriální sítě. Objevily se jak buňky s dlouhými vláknitými mitochondriemi, které vznikají nadměrnou fúzí, nebo naopak nedostatečnou fragmentací mitochondrií, tak i buňky s velmi fragmentovanou sítí. Podobné buňky s různorodou morfologií mitochondriální sítě byly pozorovány i u kontrolních kultur. Morfologie mitochondriální sítě se v průběhu buněčného cyklu dynamicky mění. Její fragmentace se většinou těsně před mitózou zvyšuje (Zunino et al. 2009). Vzhledem k heterogenitě morfologie mitochondriálních sítí u asynchronních buněčných kultur není možné popsat jednotný trend v morfologii mitochondriální sítě po kultivaci s PABA.

Značení sondou MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator kultur HSF1-HSF3 a HEK293 odhalilo mírný nárůst koncentrace superoxidových radikálů. Po optimalizaci značení a expozičního času bylo patrné, že kontrolní kultury takřka žádný signál nevykazovaly s výjimkou kultury HSF3. Buňky po čtyřdenní kultivaci s PABA

vykazovaly jen mírný nárůst fluorescenčního signálu u kultur HSF1 a HSF2. Vzhledem ke zvýšenému množství superoxidových radikálů u kontroly HSF3 se signál po čtyřdenní kultivaci takřka nezměnil. U linie HEK293 bylo v kontrole zaznamenán velmi slabý signál, který se po čtyřdenní kultivaci několikanásobně zvýšil (Obrázek 12). Zvýšení přítomnosti superoxidových radikálů koresponduje s rolí CoQ₁₀ jako antioxidačního činidla v buňce. Hlavním zdrojem superoxidových radikálů jsou mitochondrie (Brand, 2010), ale existuje celá řada jiných možných zdrojů, např. NADH oxidáza na cytoplazmatické membráně (GomezDiaz et al., 1997), flavinové oxidázy v peroxisomech (Halliwell and Gutteridge, 1984) nebo cytochrom P450 na endoplazmatickém retikulu (Cadenas et al., 1992). Skutečnost, že se jedná o vliv snížené koncentrace CoQ₁₀ a nikoli působení PABA na jiné enzymy podporuje pozorování, že po kultivaci buněk s exogenním přídavkem CoQ₁₀ dochází opět ke snížení přítomnosti superoxidových radikálů na úroveň kontroly (Gonzalez-Aragon et al., 2005).

Fluorescenční značení pomocí dihydroethidia vizualizuje přítomnost superoxidových radikálů v cytoplasmě a částečně i přítomnost dalších reaktivních forem kyslíku (Janes et al., 2004). U kultur HSF1 a HSF2 bylo zaznamenáno zvýšení přítomnosti superoxidových radikálů, což koresponduje s výsledky značení MitoSOX. Kontrolní kultury HSF3 a HEK293 poskytovaly výraznější fluorescenční signál, ale po čtyřdenní kultivaci s PABA se již nezvyšoval. V případě HEK293 lze tento jev interpretovat jako zvýšenou koncentraci ROS, která je typická pro nádorové a imortalizované buňky (Szatrowski and Nathan, 1991). Přítomnost ROS u kontrolních buněk kultury HSF3 dá vysvětlit původem kultury. Ta pochází z biopsie kůže předloktí 49letého muže. Na základě rozsáhlé studie na lidských fibroblastech pocházejících z biopsií ve věku od 20 týdnů do 103 let života je známo, že po čtyřicátém roce života dochází k výraznému poklesu syntézy mitochondriálních proteinů a dysfunkci oxidativní fosforylace vlivem sníženého membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně (Greco et al., 2003). Dysfunkce dýchacího řetězce, který je hlavním producentem ROS v buňce, může mít za následek zvýšení koncentrace ROS a oxidativní stres.

Snímky ultrastruktury mitochondrií neodhalily vážnější poškození po čtyřdenní kultivaci s PABA. Mitochondrie kultur HSF1 – HSF3 a HEK293 měly zřídka po kultivaci s PABA snížené množství krist. Objevovaly se i mitochondrie s normální ultrastrukturou. Ultrastruktura mitochondrií byla u všech kultur heterogenní. Nelze vyloučit, že se jedná o jev nesouvisející s působením PABA a sníženou koncentrací CoQ₁₀, nýbrž že jde o fyziologický jev, který souvisí se stářím buněk, nebo fází buněčného cyklu. Vzhledem k heterogenní ultrastruktuře mitochondrií kontrolních buněk (zejména HEK293) lze ze získaných snímků

jen těžko vyvozovat konkrétní změny v ultrastruktuře mitochondrií na modelu deficiencie CoQ₁₀.

6.3 Biochemické analýzy

Jednou z hlavních doposud popsaných funkcí CoQ₁₀ je přenos elektronů mezi komplexy dýchacího řetězce. Lze tedy předpokládat, že deficit CoQ₁₀ bude mít dopad i na OXPHOS systém mitochondrií. Rozhodli jsem se proto využít biochemické metody rutinně používané v naší laboratoři i pro studium našeho modelu. Jednalo se o spektrofotometrické metody měření aktivit enzymů dýchacího řetězce či o elektroforetické a blotovací techniky pro studium množství a podjednotkového složení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce.

Podobně jako v případě měření koncentrace CoQ₁₀, i v případě měření aktivit enzymů OXPHOS můžeme vidět buněčně specifické změny po kultivaci s PABA. U linie HEK293 a kultury HSF3 změny neodpovídaly změnám u kultur HSF1 a HSF2. Jak již bylo zmíněno (6.2), tyto rozdíly lze připisovat odlišnému metabolickému nastavení linie HEK293 a příp. původu kultury HSF3.

Zajímavým výsledkem ovšem zůstává jednoznačné snížení spřažených aktivit komplexů I-III a event. i II-III. Snížení spřažené aktivity II-III zaznamenaly i studie na linii HL-60 a neuroblastomu SHSY-5Y (Gonzalez-Aragon et al., 2005); (Duberley et al. 2010). Gonzalez-Aragon et al. uvádějí, že aktivita komplexu II-III po čtyřdenní kultivaci buněk HL-60 s PABA klesala na zhruba 22 % kontroly, aktivita II-III ale nebyla v tomto případě vztažena na referenční citrátsyntázu. Aktivity dalších komplexů dýchacího řetězce autoři neuvádějí. Duberley et al. zjistili, že u buněk SHSY-5Y kultivovaných s 1mM PABA významně klesá aktivita komplexu II-III. Po vztažení aktivity na aktivitu referenční citrátsyntázy deklarují pokles aktivity komplexu II-III o 99,66 % kontroly. Také produkce ATP byla snížena – na 15,39 % kontroly. Snížení spřažených aktivit komplexů I-III a II-III ve svalu jsou velmi častým nálezem pacientů s deficiencí CoQ₁₀ (viz např. 3.5.1.1, 3.5.2.1, 3.5.3.1). Aktivity dalších komplexů dýchacího řetězce studie neuvádí.

Snížení spřažené aktivity komplexu I-III a II-III lze vysvětlit podobně – je-li CoQ₁₀ limitujícím faktorem přenosu elektronů mezi komplexy I a III event. II a III, jeho snížená koncentrace se odrazí jako snížení aktivity enzymů, protože reakční centra enzymů nejsou dostatečně rychle regenerována. Snížení aktivity I-III koreluje s relativní koncentrací CoQ₁₀ po čtyřdenní kultivaci s PABA vztaženou na kontrolní kulturu (Graf 3). Měření spřažených

aktivit I-III a II-III se tedy jeví jako vhodná metoda, která usnadní diagnostiku pacientů s deficiencí CoQ₁₀.

Imunodetekce podjednotek enzymů OXPHOS na Western blotu ukazuje na proteinové úrovni, jak kultury HSF1 – HSF3 a HEK293 reagovaly na snížení hladiny CoQ₁₀. Analýza vybraných podjednotek ukázala, že kultury po kultivaci s PABA mohou reagovat jak zvýšením exprese podjednotek enzymů OXPHOS (a pravděpodobně tedy celého komplexu), tak i relativním snížením jejich exprese. Kvantifikace signálu vybraných podjednotek neukazuje žádné specifické změny, které by byly charakteristické pro odpověď buňky na vyvolanou deficienci CoQ₁₀. Vzhledem k nekoherentním výsledkům (viz Tabulka 12) nelze v tuto chvíli imunodetekci podjednotek enzymů OXPHOS (NDUFB6, SDH-70kDa, Core1, Core2, Cox2, CoxVa a ATP- α) doporučit a pro další studium je nutno analyzovat větší počet studovaných zdravých tkáňových kultur HSF.

7 Závěr

Cíle této práce byly: (1) zavést molekulární diagnostiku kódujících sekvencí genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*, (2) analyzovat kódující sekvence genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX* u vybraných pacientů s podezřením na primární deficienci koenzymu Q₁₀ a (3) studovat model deficiencie koenzymu Q₁₀ *in vitro* na kulturách kultivovaných fibroblastů zdravých kontrol a linii HEK293.

K cíli 1:

Zoptimalizovala jsem metody High Resolution Melting Analysis a přímé sekvenování genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX*. Obě metody jsou připraveny k použití pro rutinní diagnostiku těchto genů v laboratoři.

K cíli 2:

Zanalyzovala jsem kódující sekvence a jim přilehlé intronní sekvence genů *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ9*, *CABC1* a *APTX* vybraných pacientů s podezřením na primární deficienci CoQ₁₀. V analyzovaných sekvencích jsem našla čtyři známé polymorfismy, nenalezla jsem žádné patogenní mutace. Absence výskytu patogenní mutace v exonech studovaných genů nemůže vyloučit primární deficienci CoQ₁₀. V případě trvalého podezření na onemocnění způsobené poruchou některého z těchto genů je potřeba pokračovat v dalších molekulárně-genetických analýzách na úrovni cDNA, či biochemických analýzách na úrovni exprese proteinu a její regulace. Nelze také vyloučit, že pacienti nesou patogenní mutaci v některém z dalších genů kódujících enzymy biosyntézy CoQ₁₀, které nebyly dosud objeveny.

K cíli 3:

Studium kultur lidských kožních fibroblastů a linie HEK293 ukázalo, že působením 4-aminobenzoové kyseliny (PABA) dochází v obou typech buněk ke snížení koncentrace CoQ₁₀ až na 41 % kontroly.

Viabilita buněk ani morfologie mitochondriální sítě působením PABA nebyly ve studovaných liniích ovlivněny. Po čtyřdenní kultivaci s PABA dochází k mírnému zvýšení přítomnosti reaktivních forem kyslíku, zejména superoxidových radikálů. Ultrastruktura mitochondrií nebyla pozměněna.

Spřažené aktivity komplexu I-III a II-III se po kultivaci s PABA snižují na zhruba 40, resp. 70 % kontroly. Měření těchto aktivit na úrovni kultivovaných fibroblastů pacientů lze doporučit jako diagnostickou metodou deficiencie CoQ₁₀. Expres podjednotek enzymů

dýchacího řetězce v lidských kožních fibroblastech a HEK293 buňkách po kultivaci s PABA nevykazuje jednotný trend.

Přestože odpověď lidských kožních fibroblastů na působení inhibitoru není tak intenzivní jako u buněk nádorových, je dostatečná. Kultury kožních fibroblastů lze tedy i nadále využívat pro studium deficiencie CoQ₁₀.

8 Literatura

- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S. F., Katyal, S., Clements, P. M., McKinnon, P. J., Caldecott, K. W., and West, S. C. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* *443*, 713-716.
- Alam, S. S., Nambudiri, A. M., and Rudney, H. (1975). J-Hydroxybenzoate: polyprenyl transferase and the prenylation of 4-aminobenzoate in mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* *171*, 183-190.
- Andersson, M., Elmberger, P. G., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. (1990). Rates of Cholesterol, Ubiquinone, Dolichol and Dolichyl-P Biosynthesis in Rat-Brain Slices. *Febs Letters* *269*, 15-18.
- Ashby, M. N., and Edwards, P. A. (1990). Elucidation of the Deficiency in 2 Yeast Coenzyme-Q Mutants - Characterization of the Structural Gene Encoding Hexaprenyl Pyrophosphate Synthetase. *Journal of Biological Chemistry* *265*, 13157-13164.
- Aure, K., Benoist, J. F., Ogier de Baulny, H., Romero, N. B., Rigal, O., and Lombes, A. (2004). Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* *63*, 727-729.
- Bentinger, M., Dallner, G., Chojnacki, T., and Swiezewska, E. (2003). Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free Radic Biol Med* *34*, 563-575.
- Bentinger, M., Tekle, M., and Dallner, G. (2010). Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *396*, 74-79.
- Bhagavan, H. N., and Chopra, R. K. (2006). Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res* *40*, 445-453.
- Bousquet, I., Dujardin, G., and Slonimski, P. P. (1991). ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc 1 complex. *EMBO J* *10*, 2023-2031.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brand, M. D (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* *45*, 466-472.
- Cadenas, E., Hochstein, P., and Ernster, L. (1992). Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* *65*, 97-146.
- Crane, F. L., Sun, I. L., Clark, M. G., Grebing, C., and Low, H. (1985). Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *Biochim Biophys Acta* *811*, 233-264.
- Curcoy, A., Olsen, R. K., Ribes, A., Trenchs, V., Vilaseca, M. A., Campistol, J., Osorio, J. H., Andresen, B. S., and Gregersen, N. (2003). Late-onset form of beta-electron transfer flavoprotein deficiency. *Mol Genet Metab* *78*, 247-249.
- Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., *et al.* (2001). Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* *29*, 184-188.
- DiMauro, S., Hirano, M., and Schon, E. A. (2006). Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* *34*, 265-283.
- Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F. M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G. M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., *et al.* (2007). COQ2

- nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 18, 2773-2780.
- Doring, F., Schmelzer, C., Lindner, I., Vock, C., and Fujii, K. (2007). Functional connections and pathways of coenzyme Q(10)-inducible genes: an In-silico study. *IUBMB Life* 59, 628-633.
- Duberley, K. E. C., Heales, S. J. R., Rahman, S., Allen, G., Hargreaves, I. P. (2010). Establishment of a neuronal cell model of coenzyme Q10 deficiency: Implications for pathogenesis and treatment of disorders of coenzyme Q10 biosynthesis. *J Inherit MetabDis* 33 (Suppl 1): S1-S197.
- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., Lopez, L. C., Hirano, M., Quinzii, C. M., Sadowski, M. I., Hardy, J., *et al.* (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 84, 558-566.
- Echtay, K. S., Winkler, E., Frischmuth, K., and Klingenberg, M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1416-1421.
- Emelyanov, V. V. (2001). Evolutionary relationship of Rickettsiae and mitochondria. *FEBS Lett* 501, 11-18.
- Ernster, L., and Forsmarkandree, P. (1993). Ubiquinol - an Endogenous Antioxidant in Aerobic Organisms. *Clinical Investigator* 71, S60-S65.
- Festenstein, G. N. (1955). The effect of ergosterol and ergocalciferol on the anaerobic glycolysis of rat-liver slices. *Biochem J* 59, 605-609.
- Festenstein, G. N., Heaton, F. W., Lowe, J. S., and Morton, R. A. (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (lambda max. 272 m mu). *Biochem J* 59, 558-566.
- Forsman, U., Sjöberg, M., Turunen, M., Sindelar, P.J. (2010). 4-Nitrobenzoate inhibits coenzyme Q biosynthesis in mammalian cell cultures. *Nat chem biol* 6, 515-7.
- Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.
- GomezDiaz, C., RodriguezAguilera, J. C., Barroso, M. P., Villalba, J. M., Navarro, F., Crane, F. L., and Navas, P. (1997). Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q(10) reductase in the plasma membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29, 251-257.
- Gonzalez-Aragon, D., Buron, M. I., Lopez-Lluch, G., Herman, M. D., Gomez-Diaz, C., Navas, P., and Villalba, J. M. (2005). Coenzyme Q and the regulation of intracellular steady-state levels of superoxide in HL-60 cells. *Biofactors* 25, 31-41.
- Greco, M., Villani, G., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Papa, S., and Attardi, G. (2003). Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J* 17, 1706-1708.
- Gupta, R. S., and Golding, G. B. (1996). The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem Sci* 21, 166-171.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14.
- Hamilton, S. J., Chew, G. T., and Watts, G. F. (2007). Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 4, 89-102.
- Hirst, J. (2010). Progress towards the molecular mechanism of mitochondrial complex I. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1797, 9-9.

- Iiizumi, M., Arakawa, H., Mori, T., Ando, A., and Nakamura, Y. (2002). Isolation of a novel gene, CABC1, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of bc1 complex. *Cancer Res* 62, 1246-1250.
- Janes, M. S., Hill, D. M., Cardon, C. M., Robinson, K. M., Walls, J. R., Leung, W., Beckman, J. S., Ignatius, M. J. (2004). Fluorogenic detection of mitochondrial superoxide in live cells. Presented at The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting, Washington, DC – December 4-8, 2004. (www.probes.com)
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Hsieh, E. J., Wu, M., Barros, M. H., Clarke, C. F., and Tzagoloff, A. (2005). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 31397-31404.
- Kijas, A. W., Harris, J. L., Harris, J. M., and Lavin, M. F. (2006). Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J Biol Chem* 281, 13939-13948.
- Kumai, T., Matsumoto, N., Koitabashi, Y., Takeba, Y., Oonuma, S., Sekine, S., Tadokoro, M., and Kobayashi, S. (2005). Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: candidate mechanisms for anti-lipid deposition in blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3, 195-201.
- Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., Lopez, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., Makri, S., Ali-Pacha, L., Benhassine, T., *et al.* (2008). ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 82, 661-672.
- Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D. C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., Lynch, D., Banwell, B., Berg, M., *et al.* (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60, 1206-1208.
- Le Ber, I., Dubourg, O., Benoist, J. F., Jardel, C., Mochel, F., Koenig, M., Brice, A., Lombes, A., and Durr, A. (2007). Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology* 68, 295-297.
- Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L., Giuliano, G., Merlo Pich, M., Paolucci, U., Parenti Castelli, G., and Ventura, B. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 959, 199-213.
- Lenaz, G., Fato, R., Di Bernardo, S., Jarreta, D., Costa, A., Genova, M. L., and Parenti Castelli, G. (1999). Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes. *Biofactors* 9, 87-93.
- Liang, W. C., Ohkuma, A., Hayashi, Y. K., Lopez, L. C., Hirano, M., Nonaka, I., Noguchi, S., Chen, L. H., Jong, Y. J., and Nishino, I. (2009). ETFDH mutations, CoQ10 levels, and respiratory chain activities in patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuromuscul Disord* 19, 212-216.
- Lopez-Martin, J. M., Salviati, L., Trevisson, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., Hirano, M., Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M. D., Sanchez-Alcazar, J. A., *et al.* (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 16, 1091-1097.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Luft, J. H. (1956). Permanganate - a New Fixative for Electron Microscopy. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2, 799-&.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- Marin-Hernandez, A., Rodriguez-Enriquez, S., Vital-Gonzalez, P. A., Flores-Rodriguez, F. L., Macias-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., and Moreno-Sanchez, R. (2006). Determining

- and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273, 1975-1988.
- Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59, 137-139.
- Mollet, J., Delahodde, A., Serre, V., Chretien, D., Schlemmer, D., Lombes, A., Boddaert, N., Desguerre, I., de Lonlay, P., de Baulny, H. O., *et al.* (2008). CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* 82, 623-630.
- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A., and Rotig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* 117, 765-772.
- Moreira, M. C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Uchida, E., Gibson, T., Mendonca, P., Costa, M., Barros, J., Yanagisawa, T., *et al.* (2001). The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29, 189-193.
- Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274, 1393-1418.
- Mosca, F., Fattorini, D., Bompadre, S., and Littarru, G. P. (2002). Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step. *Anal Biochem* 305, 49-54.
- Musumeci, O., Naini, A., Slonim, A. E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G. L., Krawiecki, N., Weissman, B. M., Tsao, C. Y., Mendell, J. R., Shanske, S., *et al.* (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56, 849-855.
- Ogasahara, S., Engel, A. G., Frens, D., and Mack, D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2379-2382.
- Osgood, P. J., Moss, S. H., and Davies, D. J. (1982). The sensitization of near-ultraviolet radiation killing of mammalian cells by the sunscreen agent para-aminobenzoic acid. *J Invest Dermatol* 79, 354-357.
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G., *et al.* (2003). Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *Journal of Biological Chemistry* 278, 28220-28228.
- Quinzii, C., Naini, A., Salvati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 78, 345-349.
- Quinzii, C. M., Kattah, A. G., Naini, A., Akman, H. O., Mootha, V. K., DiMauro, S., and Hirano, M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 64, 539-541.
- Rahman, S., Hargreaves, I., Clayton, P., and Heales, S. (2001). Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediatr* 139, 456-458.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- Saiki, R., Nagata, A., Kainou, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2005). Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *FEBS J* 272, 5606-5622.
- Salvati, L., Sacconi, S., Murer, L., Zacchello, G., Franceschini, L., Laverda, A. M., Basso, G., Quinzii, C., Angelini, C., Hirano, M., *et al.* (2005). Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65, 606-608.

- Sano, Y., Date, H., Igarashi, S., Onodera, O., Oyake, M., Takahashi, T., Hayashi, S., Morimatsu, M., Takahashi, H., Makifuchi, T., *et al.* (2004). Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol* 55, 241-249.
- Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X. F., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997). Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (dps) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant. *Journal of Biochemistry* 121, 496-505.
- Szatrowski, T. P., and Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51, 794-798.
- Szkopinska, A. (2000). Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim Pol* 47, 469-480.
- Tekle, M., Turunen, M., Dallner, G., Chojnacki, T., and Swiezewska, E. (2008). Investigation of coenzyme Q biosynthesis in human fibroblast and HepG2 cells. *J Biochem Biophys Methods* 70, 909-917.
- Thomas, S. R., Neuzil, J., and Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 687-696.
- Tran, U. C., and Clarke, C. F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7 Suppl, S62-71.
- Tranchant, C., Fleury, M., Moreira, M. C., Koenig, M., and Warter, J. M. (2003). Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology* 60, 868-870.
- Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660, 171-199.
- Tzagoloff, A., and Dieckmann, C. L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 54, 211-225.
- Uchida, N., Suzuki, K., Saiki, R., Kainou, T., Tanaka, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2000). Phenotypes of fission yeast defective in ubiquinone production due to disruption of the gene for p-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase. *J Bacteriol* 182, 6933-6939.
- Wallace, D. C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 363-374.
- Zhang, Y., Turunen, M., and Appelkvist, E. L. (1996). Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells. *J Nutr* 126, 2089-2097.
- Zunino, R., Braschi, E., Xu, L., and McBride, H. M. (2009). Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem* 284, 17783-17795.

9 Seznam zkratek

aa	aminokyselina/-y (z angl. <u>a</u> mino <u>a</u> cid)
ATP	adenosin 5`-trifosfát
bp	páry nukleotidů (z angl. <u>b</u> ase <u>p</u> air)
bpn	<u>b</u> ez <u>p</u> atologického <u>n</u> álezu
Calcein AM	kalcein, LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA)
cDNA	komplementární DNA (reverzní transkript mRNA)
Coq2p	produkt genu <i>COQ2</i>
CoQ ₁₀	koenzym Q ₁₀ (v této diplomové práci výhradně „celkový CoQ ₁₀ “, není-li uvedeno jinak)
DHE	dihydroethidium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvojvláknová DNA
DTNB	5,5`-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EthD-1	ethidiumbromid, LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA)
gDNA	genomická DNA
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSF	kultrura lidských kožních fibroblastů (z angl. <u>h</u> uman <u>s</u> kin <u>f</u> ibroblast)
kDa	atomová hmotnostní jednotka – Da – dalton, kDa – kilodalton (10 ³ Da)
(V)LDL	lipoprotein o (velmi) nízké hustotě (z angl. (<u>v</u> ery) <u>l</u> ow <u>d</u> ensity lipoprotein)
MPT pór	složitý proteinový klastr tvořící pór v mitochondriální membráně, (z angl. <u>m</u> itochondria <u>p</u> ermeability <u>t</u> ransition)
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NC-IUBMB	názvoslovný výbor (z angl. <u>N</u> omenclature <u>C</u> ommittee of the <u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>B</u> iochemistry and <u>M</u> olecular Biology)
NF-κB	skupina transkripčních faktorů, které se váží na promotory RNA polymerázy II
OXPHOS	oxidativní fosforylace
PABA	4-aminobenzoová kyselina
PCBA	4-chlorbenzoová kyselina

PDS	polyprenyldifosfát syntáza
<i>p</i> -HB	4-hydroxybenzoová kyselina
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PP	difosfát
PPAR- α	receptor, (z angl. <u>P</u> eroxisome <u>p</u> roliferator- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor <u>a</u> lpha)
RCF	relativní síla centrifugy (z angl. <u>r</u> elative <u>c</u> entrifugal <u>f</u> orce)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SNP	jednobázový polymorfismus (z angl. <u>s</u> ingle- <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism)
ssRNA	jednovláknová RNA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethan-1,2-diamin

10 Vysvětlivky

Xd	– věk - počet dní (X – číslo)
Xm	– věk - počet měsíců
Xl	– věk – počet let
rsXXXXXXXXXX	– specifické označení polymorfismu či mutace; databáze SNP, http://ncbi.nlm.nih.gov/snp
ID: XXXXX	– identifikační číslo genu dle databáze Gene; http://ncbi.nlm.nih.gov/gene
OMIM:XXX	– identifikační číslo dle databáze Online Mendelian Inheritance in Man; http://ncbi.nlm.nih.gov/omim
NC_000010.10 26986595..27035727	– označení kódující sekvence podle http://ncbi.nlm.nih.gov/
EC 1.3.5.6	– klasifikační číslo enzymu (Enzyme Commission number) dle nomenklatury NC-IUBMB (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/)
g.799T>G	– mutace na pozici 799 gDNA, záměna původního thymidinu za guanin
c.123A>T	– mutace na pozici 123 cDNA, záměna původního adeninu za thymin
c.169 + 22T>A	– pozice intronní mutace či polymorfismu; záměna thyminu za mutantní adenin 22 nukleotidů za posledním nukleotidem nejbližšího předcházejícího exonu, který odpovídá 169. pozici cDNA
c.170 – 10G>A	– pozice intronní mutace či polymorfismu; záměna guaninu za mutantní adenin 10 nukleotidů před prvním nukleotidem nejbližšího následujícího exonu, který odpovídá 170. pozici cDNA
p.D308E	– záměna aminokyselin v řetězci mutantního proteinu na pozici 308, kyselina asparagová je nahrazena kyselinou glutamovou

11 Slovník pojmů

akrální	- okrajový
anémie	- chudokrevnost
ascites	- hromadění tekutiny v břišní dutině
ataxie	- porucha hybnosti způsobená onemocněním nervové soustavy – mozečku; projevuje se nesouměrností pohybů a jejich špatnou koordinací
atrofie	- zmenšení a chřadnutí orgánu či tkáně
<i>cerebellum</i>	- mozeček
deficience	- nedostatek, nedokonalost
encefalopatie	- obecný název pro nezánettivé onemocnění mozku
epilepsie	- skupina onemocnění mozku projevující se opakovanými záchvaty různého charakteru doprovázené většinou poruchou vědomí
<i>floppy baby</i>	- fenotyp novorozence se sníženým svalovým napětím, „hadrová panenka“
glomerulopatie	- poškození ledvinných glomerulů
glukourie	- výskyt cukrů v moči
hemourie	- výskyt krve v moči
hepatomegalie	- chorobné zvětšení jater
hypoalbuminemie	- snížená koncentrace albuminu v krevní plazmě např. způsobená poruchami syntézy v játrech
hypotonie	- snížené svalové napětí, síla
chromozomální aberace	- mutace měnící tvar a strukturu chromozómů
kardiomyopatie	- onemocnění srdeční svaloviny (z různých příčin)
kraniofaciální dysmorfie	- abnormální tvar lebky a tváře
Leigh syndrom	- progresivní neurodegenerativní onemocnění, které patří mezi nejčastější mitochondriální onemocnění dětského věku, při vyšetření magnetickou rezonancí mozku jsou patrná symetrická nekrotická ložiska v oblasti bazálních ganglií a mozkového kmene
<i>livedo reticularis</i>	- prosvítání rozšířených kožních cév
malabsorpce	- narušené vstřebávání živin z potravy v trávicím ústrojí

missense mutace	
myalgie	- bolesti svalů
myoglobinurie	- výskyt myoglobinu v moči
myopatie	- obecný název pro svalové nezánettivé onemocnění nebo svalovou
poruchu nefrokalcinóza	- ukládání vápníku v ledvinách vedoucí k jejich poškození
nefropatie	- poškození ledvin
nefrotický syndrom	- soubor příznaků doprovázející onemocnění ledvin, projevuje se výskytem bílkovin v moči a sníženou hladinou bílkovin v krvi
„nested“ PCR	- („nested“ - angl. vložený), modifikace polymerázové řetězové reakce, která snižuje množství nespecifických produktů, které jinak kontaminují požadovaný produkt. Probíhá ve dvou reakcích. V první nasedá první pár primerů. Výsledné produkty jsou použity jako templát pro druhý pár primerů v druhé reakci. Pravděpodobnost, že produkty první reakce obsahují sekvence komplementární k druhému páru primerů je velmi malá. Přednostně je amplifikován jediný žádaný produkt, produkty první reakce v zanedbatelném množství kontaminují produkt druhé reakce.
nystagmus	- rychlé mimovolní pohyby očí
okulomotorická apraxie	- porucha schopnosti pohybu očí
oligurie	- nedostatečná tvorba moče
psychomotorická retardace	- zpomalení motorického a duševního vývoje
seps	- reakce organismu na infekci
skandovaná řeč	- řeč, při níž nemocný vyrazí první slabiku, ostatní následné slabiky polyká nebo hovoří zpomaleně s přetahováním jednotlivých slabik, např. při poškození mozečku
skríníng	- angl. <i>screen</i> = filtr – použití diagnostických testů k vyhledávání rizikových nebo nemocných osob v exponované populaci zdánlivě zdravých osob bez příznaků daného onemocnění
spasticita	- zvýšené napětí svalu
strabismus	- šilhání, abnormální souhyb očí, většinou ve vodorovné rovině.
tubulopatie	- poškození ledvinných tubulů
uroseps	- infekční onemocnění močového ústrojí
valvulopatie	- defekty funkce srdečních chlopní

12 Přílohy

12.1 Seznam příloh

12.1.1	Použité přístroje.....	80
12.1.2	Použité chemikálie.....	81
12.1.3	Roztoky.....	84

Tabulka 13: Klinické projevy pacientů s podezřením na deficienci koenzymu Q ₁₀	86
---	----

12.1.1 Použité přístroje

Analytické váhy	KERN, Německo
Blotovací aparatura	
TE77xSemiDry Blotter	Hoefer, USA
Centrifugy	
Jouan MR 23i	Jouan, Francie
Mikro 200	
Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Německo
Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech, Německo
CO ₂ inkubátor	
MCO-18AIC	Sanyo, Japonsko
Elektroforetická aparatura	BioRad, USA
HPLC	Pharmacia, USA
Laboratorní plasty	Eppendorf, Německo; Gilson, USA
Laboratorní sklo	Simax, ČR
Laminární box	
Clean Air CA/REV6	Schoeller, Holandsko
Mikroskop	
DIAPHOT 200	Nikon, Japonsko
JEM-1200Ex	JEOL, Japonsko
PCR box	Holten, Dánsko
PCR cycler	MJ Research, USA
pH metr	Hanna Instruments, Itálie
Pipety	Nichipet, Japonsko;

	Eppendorf, Německo
Sekvenátor	
ABI Prism 3100AVANT	
ABI Prism 3500xL	Applied Biosystems, USA
Spektrofotometr	
ND-1000 NanoDrop	ThermoScientific, USA
UV-2401PC	Shimadzu, Japonsko
Sušička gelů	Whatman Biometra, Německo
Termoblok	Labnet, USA
Váhy	Scaltec, USA
Vortex	IKA, Německo
Zobrazovací systém	
VersaDoc 4000 imaging systém	BioRad, USA

12.1.2 Použité chemikálie

4-aminobenzoová kyselina (PABA)	Sigma, USA
Acetylkoenzym A	Sigma, USA
Agaróza	Serva, Německo
Antimycin A	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
1,4-benzochinon	Sigma, USA
Bradford reagens	BioRad, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Cytochom <i>c</i>	Sigma, USA
2,6-DCPIP (2,6-dichlorofenol-indofenol)	Sigma, USA
Dihydroethidium (DHE)	Invitrogen, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta, ČR
Deoxycholát sodný	Penta, ČR
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, USA
DTNB	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA

Ethanol	Penta, ČR
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma, USA
Folinovo reagens	Sigma, USA
Glycin	Sigma, USA
Chlorid sodný	Penta, ČR
Kit na purifikaci PCR produktů	
Wizard SW Gel and PCR Clean-Up	Promega, USA
Koenzym Q ₁₀	Sigma, USA
Koenzym Q ₁₀ (substance)	TANAKA, Japonsko
Koktejl inhibitorů proteáz (PIC)	Roche, Švýcarsko
Kyanid draselný	Sigma, USA
Kyselina boritá	Penta, ČR
Kyselina chlorovodíková	Penta, ČR
Kyselina octová	Penta, ČR
Lihobenzín	Penta, ČR
Laurylmaltosid	Sigma, USA
LCGreen [®]	Idaho Technology Inc., USA
LIVE/DEAD [®] Viability/Cytotoxicity Kit	
* for mammalian cells	Invitrogen, USA
Malonát	Sigma, USA
Manganistan draselný	Penta, ČR
Marker molekulových hmotností	
100kbp DNA Ladder	Fermentas, Litva
SeeBlue Plus2	Invitrogen, USA
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Methanol	Penta, ČR
NADH	Sigma, USA
Oligomycin	Sigma, USA
Oxalacetát	Sigma, USA
Peroxošíran amonný	Sigma, USA
PMSF	Sigma, USA
Propan-1-ol	Penta, ČR
Minerální olej	Sigma, USA
MitoSOX [™] Red mitochondrial	

superoxide indicator	Invitrogen, USA
MitoTracker CMX Ross TM	Invitrogen, USA
Primární myší monoklonální protilátky proti:	
NDUFB6	
SDH-70kDa	
Core1	
Core2	
Cox2	
ATP- α	
Primární králičí protilátka proti:	
α -tubulinu	vše MitoSciences, USA
Rotenon	Sigma, USA
Sacharóza	Penta, ČR
Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti:	
králičímu imunoglobulinu	
myšímu imunoglobulinu	
	obojí Sigma, USA
Sekvenační kit	
Big Dye Terminátor v3.1	
Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
Serva Blue	Sigma, USA
Sukcinát	Sigma, USA
Sušené odtučněné mléko	Laktino, ČR
TEMED	Sigma, USA
Tricin	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Trypsin	Sigma, USA
Tween	Sigma, USA
Vizualizační kit	
SuperSignal WestFemto	
Sensitivity Substrate	ThermoScientific, USA

12.1.3 Roztoky

Anodový pufr	100 mM Tris-HCl, pH 8,9
Barvicí roztok	2 g Serva Blue; 13% kyselina octová; 87% ethanol
DBH ₂	10mM CoQ ₁₀ , 77% ethanol, 0,055M HCl
Gelový pufr	3 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3% SDS
Hankovo médium	PAA Laboratories, Rakousko
Katodový pufr	100 mM Tris-Cl, pH 8,9; 100 mM tricin; 0,1 % SDS
KPi	1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,0, event. 7,8
Master MIX	PPP , 2x: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl ₂ , 400 μM dATP, 400 μM aCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva Combi PPP , 2x: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl ₂ , 400 μM dATP, 400 μM aCTP, 400 μMdGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, monoklonální anti-Taq polymeráza (38 nM), stabilizátory, aditiva Plain PP , 2x: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl ₂ , 400 μM dATP, 400 μM aCTP, 400 μMdGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva Plain Combi PP , 2x: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl ₂ , 400 μM dATP, 400 μM aCTP, 400 μMdGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální anti-Taq polymeráza (38 nM), stabilizátory, aditiva ...vše Top-Bio, ČR

Odbarvovací roztok	66% dest. voda, 26% lihobenzín, 8% kyselina octová
PBS	Sigma, USA; 150mM NaCl, 150 mM Na ₃ PO ₄ , pH 7,4
Quantum 333 for Fibroblasts	PAA Laboratories, Rakousko
RIPA pufr	50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1mM PMSF; 1mM EDTA; 1 % Triton X-100; 1 % deoxycholát sodný; 0,1 % SDS; 1 % PIC (čerstvě přidaný před použitím)
Separační gel	12%: 2,4 ml H ₂ O; 3,33 ml 3x gelového pufru; 4,8 ml směsi 48% akrylamidu a 1,5% bisakrylamidu; 50 µl 10% peroxysíranu amonného; 5 µl TEMED
STE izolační roztok	10mM Tris-HCl, pH 7,4; 250 mM sacharóza; 1mM EDTA; 1% PIC (čerstvě přidaný před použitím)
Stripovací roztok	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7; 100 mM β-merkaptoethanolu; 2% SDS
TBE pufr	89mM Tris-HCl, 89mM kyselina boritá, 2mM EDTA, pH 8,0
TBS pufr	20mM Tris-Cl; 130mM NaCl, pH 7,5
TBST pufr	20mM Tris-Cl; 130mM NaCl, pH 7,5; 0,1% Tween
Transferový pufr	25mM Tris-Cl; 192mM glycin; 10% methanol; 0,02% SDS
Tris-Cl	1M Tris-Cl, pH 8,0
Vzorkový pufr	4x: 50 mM Tris-Cl, pH 6,8; 12 % glycerol; 4 % SDS; 2 % β-merkaptoethanol; 0,01 % bromfenolová modř
Zaostřovací gel	4%: 5,8 ml H ₂ O; 3,33 ml 3x gelového pufru; 0,8 ml směsi 48% akrylamidu a 1,5% bisakrylamidu; 60 µl 10% peroxosíranu amonného; 6 µl TEMED

Tabulka 13: Klinické projevy pacientů s podezřením na deficienci CoQ₁₀

Pacient	Neurologické projevy	Svalová soustava	Orgánové soustavy	Ostatní	Poznámka
P1		bolesti a únava svalů (od 4l)		hromadění produktu sukcinátdehydrogenázy	(v 16l) průměrný prospěch, zvládá přiměřenou zátěž
P2	encefalopatie, náznaky demyelinizace?	těžká hypotonie („floppy baby“)		hromadění produktu sukcinátdehydrogenázy strabismus, na zvuk nereaguje	(stav ve 2l)
P3			nefrokalcinóza, glukourie, hemourie, tubulopatie, hepatomegalie	malabsorpce, tříselná kýla	<i>exitus</i> 2l
P4		po porodu těžká hypotonie	kardiomyopatie		neschopnost ventilace, srdeční selhání (bratr <i>exitus</i>) <i>exitus</i> 6d
P5		ponámahové myalgie	myoglobinurie		(stav v 22l)
P6	psychomotorická retardace, epilepsie	akrální spasticita		strabismus, neprospívání, kraniofaciální dysmorfie	
P7		svalová dystrofie, hypotonie			(stav v 15m)
P8			kardiomyopatie	ascites	získané chromozomální aberace, chronická sepse <i>exitus</i> 1m <i>exitus</i> 2l
P9	neurodegenerativní encefalopatie,	těžká hypotonie			<i>exitus</i> 2l
P11	psychomotorická retardace	hypotonie	kardiomyopatie urosepse	atrofie očního nervu, částečná hluchota	<i>exitus</i> v 6l
P12	atrofie <i>cerebella</i> epilepsie (23m) a ataxie (od 7l)	poruchy chůze		strabismus, skandovaná řeč, nystagmus	(stav v 17l)

- d/m/l – věk: dny/měsíce/roky